



**HAL**  
open science

# La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris pathovar malvacearum* : Rôle du gène GhLOX1 dans la réaction hypersensible

Majd Sayegh

## ► To cite this version:

Majd Sayegh. La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris pathovar malvacearum* : Rôle du gène GhLOX1 dans la réaction hypersensible. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009. Français. NNT : 2009INPL077N . tel-01748740

**HAL Id: tel-01748740**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748740v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ÉCOLE DOCTORALE  
Sciences et Ingénierie des Ressources,  
Procédés, Produits, Environnement

UMR INPL(ENSAIA)-INRA 1121 Agronomie et Environnement

## THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 12/11/2009  
pour l'obtention du titre de Docteur de l'INPL  
(Spécialité : Sciences Agronomiques)

par

Majd SAYEGH

## La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*

Rôle du gène *GhLOX1* dans la réaction hypersensible

**Directeur de thèse :** Michel NICOLE, Directeur de Recherches (IRD, Montpellier)  
**Co-directeur :** Alain CLERIVET, Maître de Conférences (Université de Montpellier 2)

### **Composition du jury :**

*Président du jury :* Emile BENIZRI, Professeur (Université de Nancy)  
*Rapporteurs :* Ismail EL HADRAMI, Professeur (Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech)  
Patrick SAINDRENAN, Chargé de Recherche, CNRS  
*Membre invité :* Jean-Luc MONTILLET, Directeur de Recherches (CEA, Cadarache)

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent avant tout à mon très cher pays, la « Syrie », ainsi que la GCSAR « General Commission For Scientific Agricultural Research » pour m'avoir octroyé une bourse tout au long des années d'étude passées en France. Je tiens également à remercier l'INPL (Institut National Polytechnique de Lorraine) où je me suis inscrite pour obtenir le diplôme de docteur d'Université.

Merci à l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) où ce travail a été effectué au sein de l'UMR RPB à Montpellier, sous la direction de Michel Nicole, Directeur de recherche. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son équipe au cours de mon cursus universitaire, pour son aide, pour ses conseils scientifiques, pour les discussions que nous avons eues tout au long de la thèse et, enfin, pour son investissement dans les corrections de ce manuscrit. Ce passage au sein de ton équipe sous ta direction restera en mémoire toute ma vie. Mille mercis !

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury, Jean-Luc Montillet, Patrick Saindrenan, Ismaïl El-Hadrami, Emile Benizri, Mahmoud Abou Ghorra, Alain Clériver et Michel Nicole pour avoir accepté de juger mon travail de thèse et de participer au jury. Reconnaissance toute particulière à Alain Clériver, co-directeur de thèse, pour son implication dans mon travail et pour sa gentillesse. J'exprime aussi ma gratitude à Armand Gückert, professeur, pour m'avoir fait confiance en me choisissant afin d'effectuer mon DEA et ma thèse en France.

Je remercie particulièrement Philippe Marmey pour son implication dans l'encadrement de mon DEA et de la première partie de thèse. Merci pour ses conseils et sa grande disponibilité. J'adresse également ma gratitude à Antony Champion qui m'a faite profiter de ses connaissances et pour ses conseils lors de la deuxième partie de cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'UMR RPB qui m'ont permis de passer ces années agréables au sein du laboratoire. J'exprime toute ma reconnaissance à Jamel Aribi pour toutes les graines du cotonnier qu'il a semées pour moi. Merci aussi à tout le personnel des serres

pour leur aide et leur gentillesse. J'adresse des remerciements sincères aux étudiants du laboratoire, passés et présents, et particulièrement, à Erika, Naoual, Alessandra, Daniel (déjà loin) pour leur amitiés, leur soutien et leur bonne humeur de tous les jours. Je remercie aussi Diana Fernandez, Anne-Sophie Petitot, Agnès Galzi, pour leur amitié et leurs encouragements.

Du point de vue enthousiasme et optimisme, ce sont Sylvie Pounhet et Éveline Déchamp que je remercie très sincèrement de leur soutien, leurs encouragements et des bons moments passés ensemble. Une mention spéciale pour Aida Jalloul, je crois que l'aboutissement de cette thèse te doit beaucoup ..... Je t'en remercie infiniment.

Merci aussi à mes amis en Syrie qui sont toujours près de moi. Merci encore à toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenue.

Je voudrais remercier plus particulièrement ma belle famille pour le soutien moral et pour leurs encouragements.

Et à vous, mes parents, à qui je pense tous les jours et que j'aime profondément, je vous remercie énormément de m'avoir conduite jusqu'ici avec amour, confiance, soutien, tendresse et force. Un grand merci à vous, surtout pour tout le reste. Il me tient à cœur de remercier mes frères et sœurs pour m'avoir supportée et soutenue et la famille de ma sœur. Merci de me donner jour après jour autant d'amour.

Mes pensées les plus chères vont à celui avec qui j'ai la chance de partager ma vie, qui m'a accompagnée toutes ces années. Il a été pour moi un soutien constant. Merci à toi Majed pour ton soutien, ton amour, ta patience et tes encouragements dans un pays étranger.

Et enfin, je reconnais qu'il n'est pas facile d'être maman et doctorante à la fois. Mais avec mes trois fleurs, Joëlle, Naya et Laure, si calmes et si patientes, les choses ont été plus faciles. Pour vous qui avez supporté quelques moments d'angoisse, je vous adresse d'immenses remerciements. Vous êtes les plus belles et les plus réussies de toutes mes expériences !

# Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	5
A. Les mécanismes de la résistance spécifique des plantes aux parasites.....	7
1. Le phénomène de reconnaissance.....	8
1.1. La reconnaissance par les éliciteurs généraux.....	8
1.2. La reconnaissance spécifique repose sur le modèle « gène pour gène ».....	11
1.2.1. Les gènes d'avirulence ( <i>Avr</i> ).....	12
1.2.2. Les gènes de résistance.....	15
2. La mort cellulaire hypersensible.....	17
3. Transduction du signal intracellulaire.....	20
3.1. Les formes réactives de l'oxygène.....	21
3.2. La réduction séquentielle de l'oxygène et les systèmes impliqués dans la production des ROS.....	22
4. Transduction du signal intercellulaire.....	25
4.1. L'acide jasmonique.....	27
4.2. Interconnexion des différentes voies de signalisation.....	30
4.2.1. Phénomène de potentialisation.....	31
4.2.2. Relations entre l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène et l'acide abscissique.....	31
B. Les phénomènes de peroxydation des lipides dans la mort cellulaire.....	33
1. Auto-oxydation des lipides.....	37
1.1 L'initiation.....	38
1.2 La propagation.....	38
1.3 La terminaison.....	40
2. L'oxydation enzymatique des acides gras polyinsaturés.....	40
2.1 Rôle du métabolisme des oxylipines dans la mort cellulaire hypersensible.....	40
2.1.1 Métabolisme d'alpha-dioxygénation.....	40
2.1.2 Peroxydation dépendante des lipoxygénases.....	41
2.1.3 Le rôle des lipases.....	45
2.1.4 Métabolisation enzymatique des hydroperoxydes d'acides gras.....	47
2.1.5 La voie des octadécanoïdes ou voie des 13-LOX.....	47
2.1.6 La voie des 9-LOX.....	49
2.2 Hypothèse sur le rôle des oxylipines électrophiles dans la mort cellulaire hypersensible.....	51
C. Les interactions cotonnier - <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>malvacearum</i> .....	51
1. Les maladies du cotonnier.....	52
2. <i>Xcm</i> : agent de la bactériose du cotonnier.....	54
2.1. Taxonomie, morphologie et physiologie.....	54
2.2. Le cycle de la bactérie.....	54
2.3 Variabilité de l'agent pathogène.....	55
3. La bactériose du cotonnier.....	55
3.1. Historique et répartition de la maladie.....	55
3.2. Les symptômes aux champs causés par <i>Xcm</i> .....	56
3.3. L'incidence de la bactériose sur la culture cotonnière.....	57
3.4 Les moyens de lutte connus contre la bactériose.....	57
4. Nature et mécanismes de la résistance du cotonnier à <i>Xcm</i> : état de l'art.....	59
D. Objectifs de la thèse.....	62
CHAPITRE 1.....	64

THE LIPOXYGENASE RESPONSE IS ASSOCIATED WITH RESISTANCE OF VARIOUS COTTON GENOTYPES TO THE BACTERIAL BLIGHT DISEASE .....	64
CHAPITRE 2.....	70
CONTRIBUTION A L'ANALYSE FONCTIONNELLE D'UNE LIPOXYGENASE DE COTONNIER : ROLE DU GENE <i>GhLOX1</i> DANS LA RESISTANCE A <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> PV <i>MALVACEARUM</i> .....	70
I. INTRODUCTION .....	71
I. MATERIELS ET METHODES .....	75
A. Matériel végétal .....	75
B. Souches bactériennes et préparation des solutions bactériennes.....	75
1. Les souches virulentes et avirulentes de la bactérie <i>Xcm</i> races 18, 20 .....	75
2. Les souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	75
3. Les cellules compétentes <i>Escherichia coli</i> 10 TOPO (Invitrogen). .....	75
4. Conditions d'inoculations et de prélèvements.....	76
C. Transformation transitoire du cotonnier.....	76
1. Test histochimique GUS .....	76
2. Dosage fluorimétrique de l'activité GUS .....	77
D. L'effet d' <i>Agrobacterium</i> sur certaines réponses de défense.....	77
E. La compatibilité entre <i>Agrobacterium</i> et <i>Xcm in vitro</i> .....	78
F. La fonction biologique du gène <i>GhLOX1</i> .....	78
1. Technologie Gateway: principe .....	78
2. Obtention des différentes constructions et souches bactériennes .....	78
3. Transformation des cotylédons du cotonnier .....	79
4. Évaluation des activités transcriptionnelles du gène <i>GhLOX1</i> .....	79
5. Évaluation des activités totale de lipoxigénase .....	81
G. Microscopie à fluorescence .....	81
II. RESULTATS .....	81
A. Mesure de l'activité GUS .....	81
B. Compatibilité entre <i>Agrobacterium ssp.</i> et <i>Xcm in vitro</i> .....	82
C. Effet d' <i>Agrobacterium</i> sur certaines réponses de défense de la plante agrotransformée. ....	83
D. Analyse fonctionnelle du gène <i>GhLOX1</i> .....	84
1. Les constructions générées .....	84
2. Effet de la surexpression du gène <i>GhLOX1</i> .....	84
3. Etude de la localisation intracellulaire de la protéine GhLOX1 dans les cotylédons transformés.....	87
IV. DISCUSSION .....	90
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	121
REFERENCES .....	130
BIBLIOGRAPHIQUES.....	130
ANNEXES .....	151
Annexe 1 : Gènes de résistance chez les plantes .....	152
PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	154
LISTE DES ABREVIATIONS .....	155
Article sur les patatines .....	

# **INTRODUCTION GENERALE**



Dans leur lutte permanente pour la survie, les plantes ont développé un système de défense diversifié qui leur permet de résister à la plupart des agressions de nature biotique (champignons, bactéries, virus, plantes parasites, nématodes ou ravageurs) ou de nature abiotique (stress hydrique, thermique, ionisant, ou pollution, *etc...*). Généralement, La maladie est l'exception, la plante répond aux stress d'origine biotique ou abiotique par la mise en place de réactions de défense variées lui permet de résister aux agents pathogènes. Ces défenses consistent en premier lieu en des barrières physiques -cuticule et la paroi cellulaire- qui empêchent la pénétration de la plupart des microbes. Si l'agent pathogène pénètre la plante et que la maladie se développe, la plante est dite sensible et l'interaction est compatible. Dans le cas contraire, si le parasite parvient à franchir les premières lignes de défense, la plante va déclencher des réactions de défense inhibant le développement de la maladie: la plante est résistante et l'interaction est incompatible ce qui se traduit, dans la plupart des cas, par la mort rapide des cellules infectées et la formation de lésions nécrotiques localisées autour des sites de pénétration du parasite. Il s'agit de la réaction d'hypersensibilité, ou RH, qui s'accompagne de modifications métaboliques importantes permettant de confiner l'agresseur à son site de pénétration (Goodman et Novacky, 1994). La RH est une forme de mort cellulaire programmée ; son déroulement nécessite d'abord la reconnaissance par la cellule hôte d'un éliciteur suivie par des événements de signalisation, de transcription d'un grand nombre de gènes de défense et de production de molécules de défense.

Des facteurs spécifiques de la plante et de l'agent pathogène déterminent la nature des interactions physiques, chimiques ou biologiques qui, s'établissant dans les tous premiers moments de leur rencontre, conditionnent l'évolution vers la résistance (incompatibilité) ou la sensibilité (compatibilité), autrement dit vers l'expression rapide ou non des mécanismes de défense. Cependant, dans la littérature, le terme RH au sens large qualifie un mécanisme de défense des plantes qui englobe la mort cellulaire et les réponses de défense associées au niveau local (Pontier *et al.*, 1998). A cette résistance s'associent deux résistances acquises : l'une locale (LAR), sur une zone de quelques millimètres autour de la zone infectée qui a été proposé comme zone de production des signaux nécessaires à l'établissement de la seconde, la résistance

systemique acquise (SAR), plus tardive et moins intense, qui met la plante dans un état de veille et la maintient prête à réagir à une attaque ultérieure (Maleck et Dietrich, 1999).

### A. Les mécanismes de la résistance spécifique des plantes aux parasites

La nature exacte des événements qui conduit à la mort cellulaire est largement étudiée. Ces études concernent le contrôle génétique des phénomènes de reconnaissance intervenant entre la plante et le microorganisme pathogène, les signaux requis pour sa mise en œuvre, la régulation et l'exécution du programme de mort cellulaire et l'activation de gènes de défense (Figure 1).

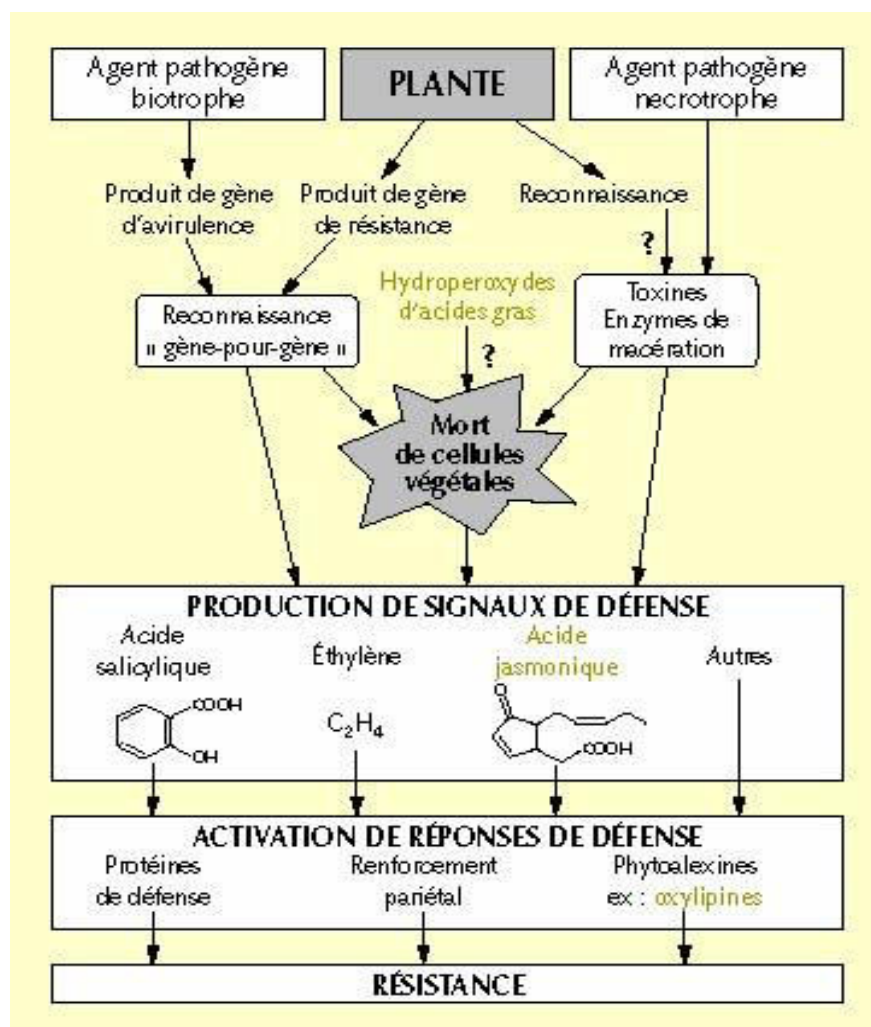


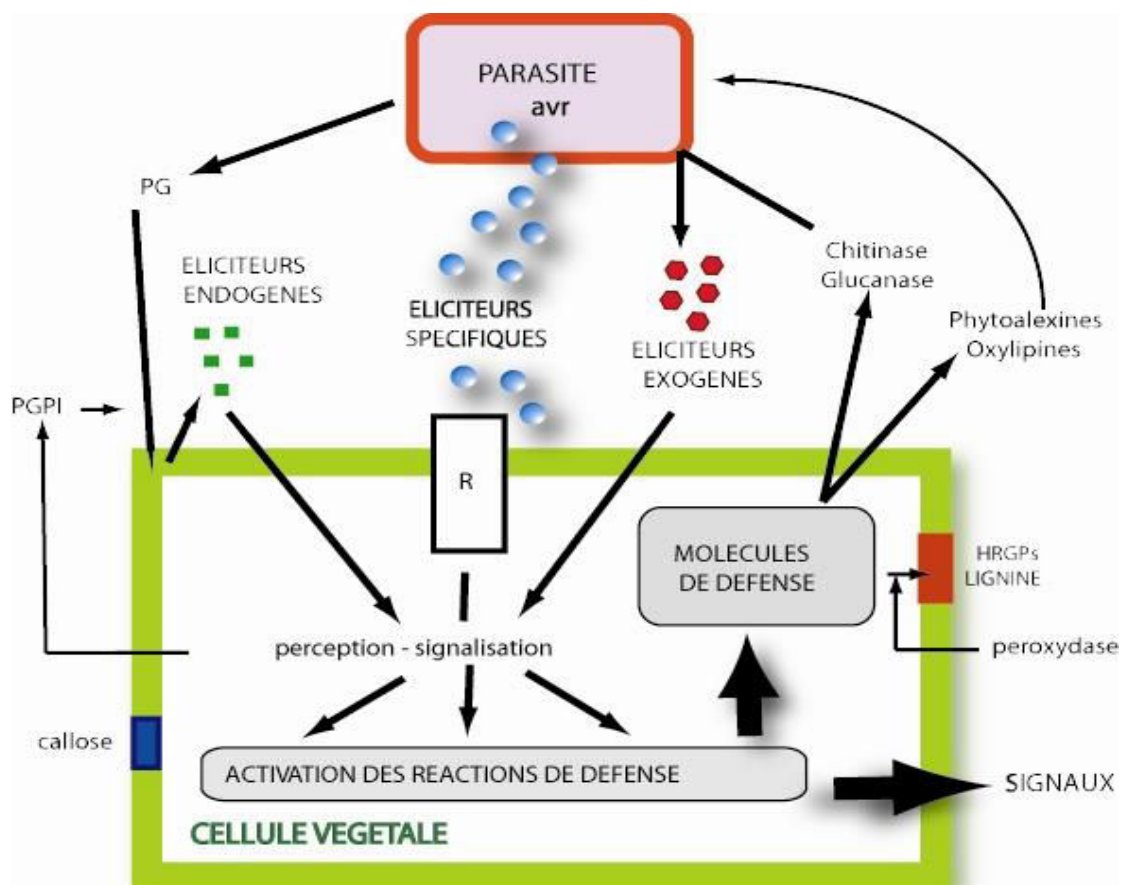
Figure 1. Événements de reconnaissance, de signalisation et réactions de défense conduisant à la mise en place d'un état de résistance. (D'après Heitz *et al.*, 2002).

## 1. Le phénomène de reconnaissance

Deux types de reconnaissance peuvent être proposés : **la reconnaissance spécifique** qui fait intervenir le produit du gène de résistance de la plante et le produit du gène d'avirulence du pathogène correspondant et **la reconnaissance non spécifique** qui implique des éliciteurs généraux.

### 1.1. La reconnaissance par les éliciteurs généraux

Un éliciteur est une molécule capable d'induire au moins une des réponses typiques de défense, comme la synthèse de phytoalexines, cela en l'absence de toute infection (Blumwald *et al.*, 1998 ; Dixon *et al.*, 1994 ; Hahn, 1996). La caractéristique principale des éliciteurs généraux est qu'ils ne reproduisent pas la spécificité de reconnaissance gène pour gène (Keen, 1990, 1992). Ils sont produits soit par les agents pathogènes (éliciteurs exogènes) ou des plantes (éliciteurs endogènes) (Figure 2). Ils sont de nature polysaccharidique, lipidique, ou (glyco) protéique (Benhamou, 1996 ; Boller, 1995 ; Côté et Hahn, 1994 ; Ebel et Mithöfer, 1998 ; Hahn, 1996).



**Figure 2 : La reconnaissance par les éliciteurs généraux**  
PG : phosphatidylglycérol ; PGPI : Plant Growth Promoting Bacteria ;  
HRGPs : Hydroxyprolin-rich GlycoProtein.

Trois types majeurs d'éliciteurs de nature polysaccharidique ont été identifiés : les  $\beta$ -1,3 glucanes, la chitine et le chitosan (chitine dé-acétylée) provenant des parois fongiques et les oligogalacturonides, résidus d'acides galacturoniques en liaison  $\alpha$ -1,4 dérivés de la pectine, issus des parois cellulaires. On peut insister sur le fait que la plupart de ces éliciteurs polysaccharidiques endogènes ou exogènes est généré par des hydrolases de l'hôte et/ou de l'agresseur. Ces molécules peuvent donc probablement intervenir comme signaux de « deuxième génération » dans la cascade de réception-transduction participant à l'expression des réponses de défense (Fritig *et al.*, 1998 ; Lamb *et al.*, 1989).

Parmi les éliciteurs lipidiques, l'acide arachidonique et d'autres acides gras insaturés, libérés lors de l'infection de la pomme de terre par *Phytophthora infestans*, figurent parmi les éliciteurs les plus efficaces de la synthèse de phytoalexines (Bostock *et al.*, 1981) et de l'activité lipoxygénase (LOX) (Bostock *et al.*, 1992). L'ergostérol, qui est le stérol majeur de la membrane lipidique chez les champignons, induit l'alcalinisation du milieu de culture de suspensions cellulaires de tomate, alors que les stérols d'origine animale ou végétale n'ont aucun effet (Granado *et al.*, 1995). Enfin, les syringolides, éliciteurs race-spécifique générés par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* portant le gène *AvrD*, induisent une RH chez les cultivars de soja portant le gène *Rpg4* (Midland *et al.*, 1993).

Les éliciteurs protéiques et glycoprotéiques sont capables d'induire une RH au même titre que les éliciteurs race-spécifiques, d'autres induisent seulement des réponses de défense sans mort cellulaire. On distingue ainsi des peptides correspondant à des domaines de la flagelline des eubactéries (Felix *et al.*, 1999), de protéine bactérienne PopA1 isolée de *Ralstonia solanacearum* (Arlat *et al.*, 1994) ou des harpines (Bauer *et al.*, 1995) et des élicitines (Ricci *et al.*, 1989).

Comme on peut le constater, il existe une grande diversité au sein des molécules susceptibles d'être reconnues par la plante mais aussi une grande diversité dans la spécificité de la perception. La perception des éliciteurs implique parfois une certaine spécificité, puisque certains éliciteurs ne sont actifs que sur une gamme donnée d'espèces végétales. Cependant, la plupart de ces molécules sont capables d'activer des mécanismes de signalisation et de défense communs. Il semble dès lors que les étapes de transduction de signaux et l'expression de réponses de défense en aval des événements de reconnaissance impliquent des mécanismes très conservés chez les plantes. Des études ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la transduction du signal intracellulaire aboutissant à l'activation des réponses de défense et de la mort cellulaire. Le modèle le plus fréquent repose sur l'affinité d'éliciteurs pour des récepteurs membranaires à l'origine d'une cascade d'événements qui va conduire à l'induction de l'expression de gènes de défense (Yang *et al.*, 1997).

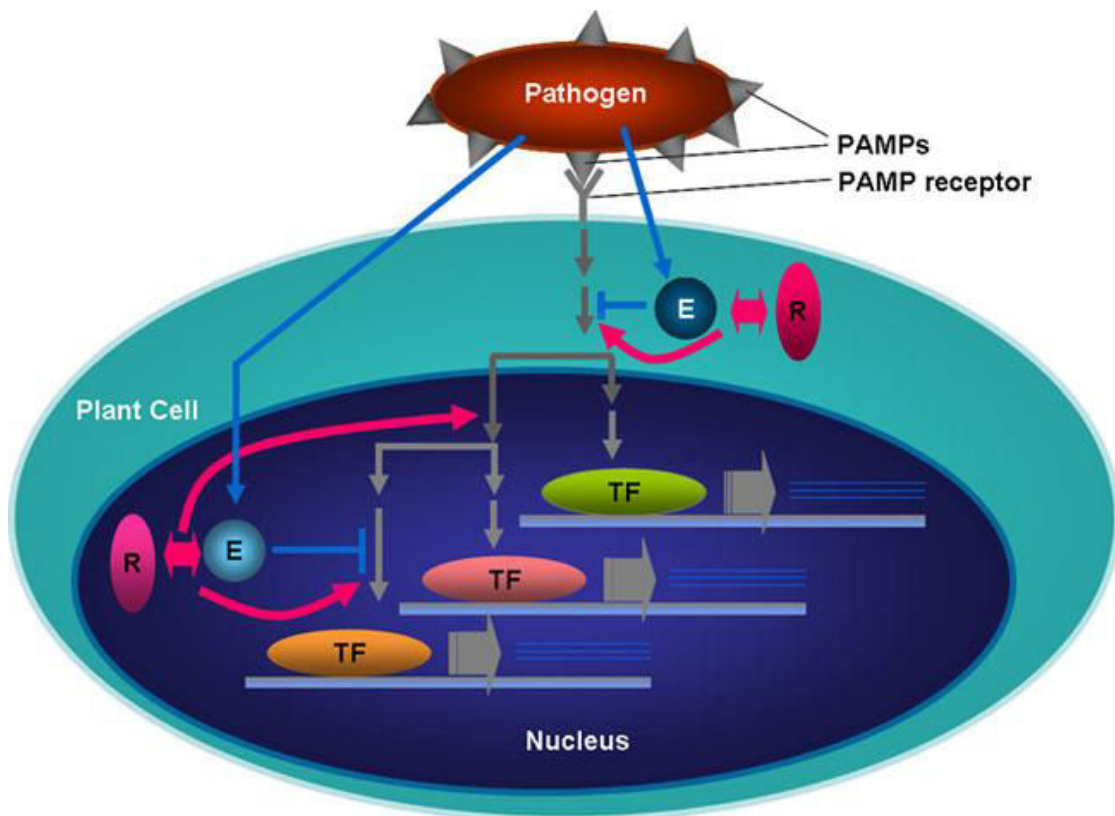
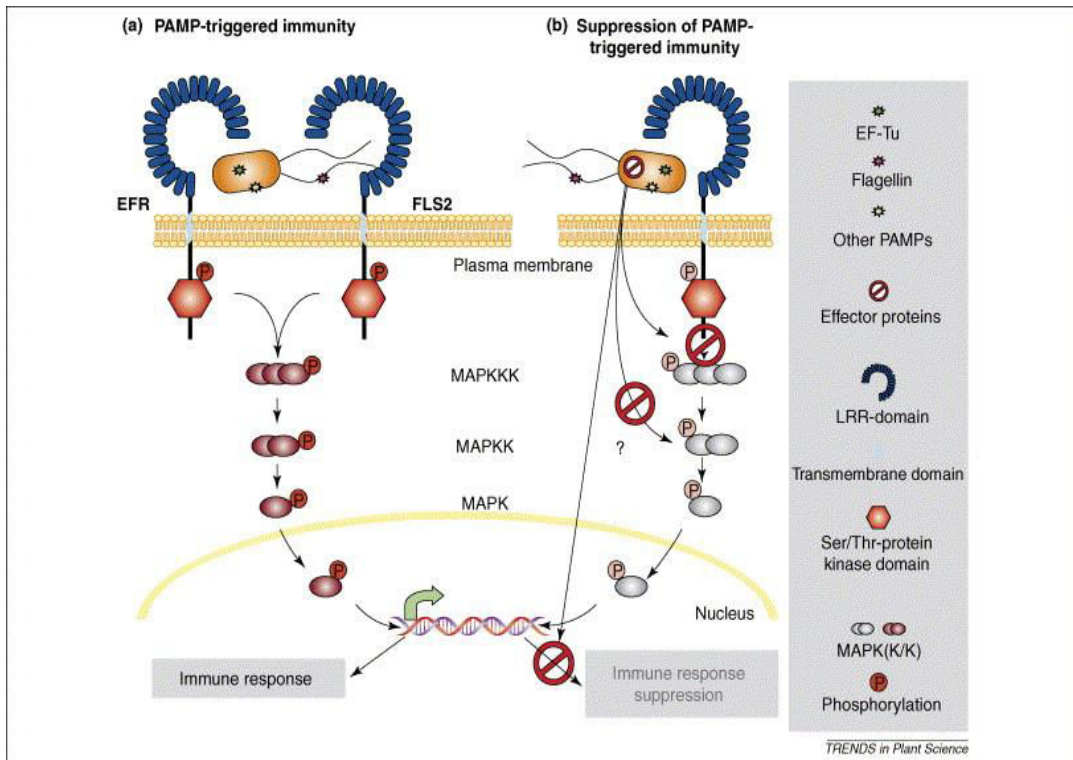


Figure 3 : La reconnaissance par les « PAMPs »,  
 (Pathogenesis-associated Molecular Patterns)  
 TF : Transcription factors : E : Effector

De nombreux éliciteurs exogènes appartiennent à la catégorie des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) (Figure 3) (Nurnberger *et al.*, 2004). Ce sont des molécules de l'agent pathogène indispensables à son mode de vie et très conservées d'une espèce à l'autre et qui n'existent pas chez la plante. La reconnaissance de ces «PAMPs» fait intervenir des récepteurs spécifiques nommés PRR pour (Pattern Recognition Receptors) au niveau de la surface cellulaire, et engendre la génération de signaux qui induisent un mécanisme nommé PTI (Pathogen-Triggered Immunity) (Boller and He, 2009 ; Jones et Dangl, 2006).

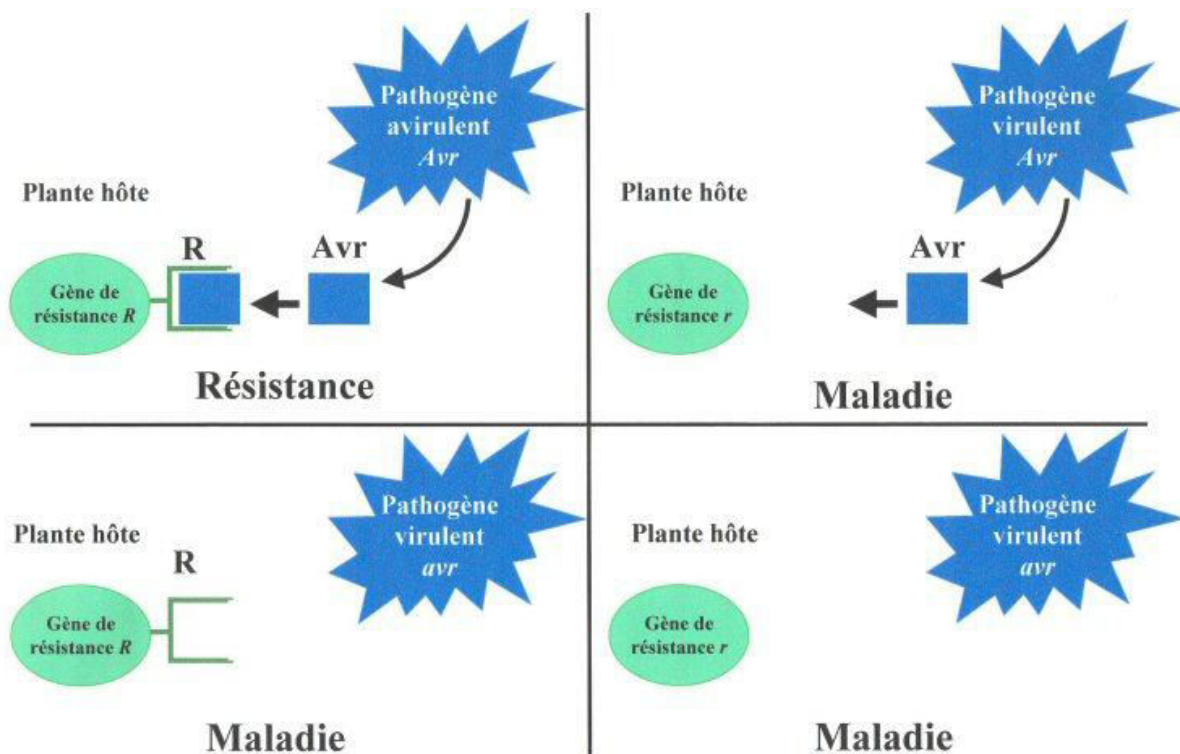


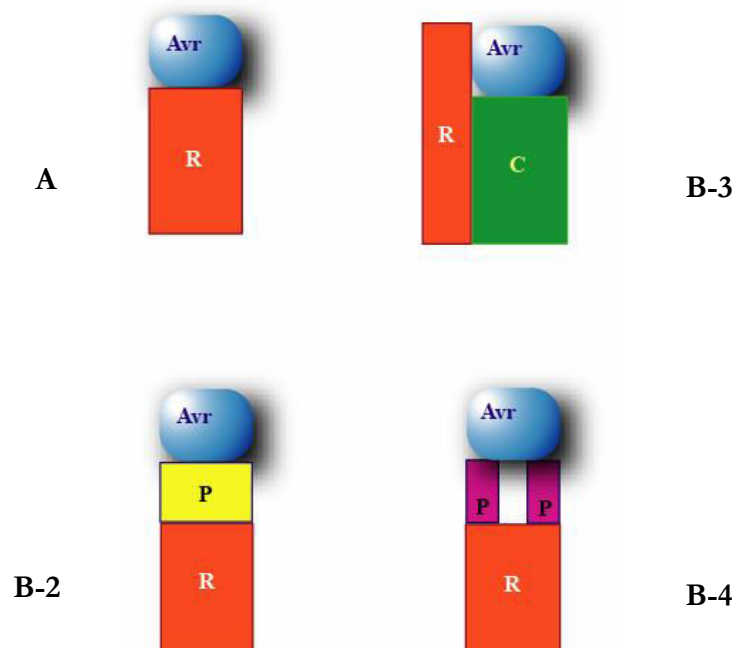
Figure 4 : la théorie gène pour gène

## 1.2. La reconnaissance spécifique repose sur le modèle « gène pour gène »

Dans certains cas de maladies microbiennes, la résistance est spécifiée par la présence chez la plante d'un gène de résistance (*R*) dominant auquel correspond chez le pathogène un gène d'avirulence (*Avr*) également dominant. Cette relation est appelée « gène pour gène » (Figure 4). L'existence des gènes d'avirulence a été découverte à l'issue d'une étude sur l'interaction entre le lin et *Melampsora lini* (Flor, 1942). Flor définit ainsi cette base génétique de la spécificité entre pathogène et hôte. Plusieurs modèles ont été proposés pour donner une interprétation physiologique de la reconnaissance « gène à gène ». Parmi eux le modèle ligand/récepteur qui postule que le produit du gène d'avirulence (*Avr*) joue le rôle de ligand spécifiquement reconnu



par un récepteur codé par le gène de résistance (*R*). Il a été validé par des preuves biochimiques et moléculaires (Keen, 1992 ; Cook, 1998) à l'aide du système double-hybride dans la levure pour deux couples *Avr/R*. Il s'agit de l'interaction entre *Avr Pto/Pto* chez la tomate (Scofield *et al.*, 1996 ; Tang *et al.*, 1996 ; Sessa et Martin, 2000) et *Avr pita/pita* chez le riz (Bryan *et al.*, 1999). L'autre modèle proposé est dit «modèle de garde», où la reconnaissance implique la présence de protéines *R* dites de « garde » et d'une protéine cible reconnue par la protéine *Avr*. L'interaction protéine *Avr*-protéine cible induit des modifications de la protéine cible qui sont perçues par la protéine *R* de garde pour déclencher les mécanismes de la HR (Jones et Dangl, 2006.) (Figure 5).

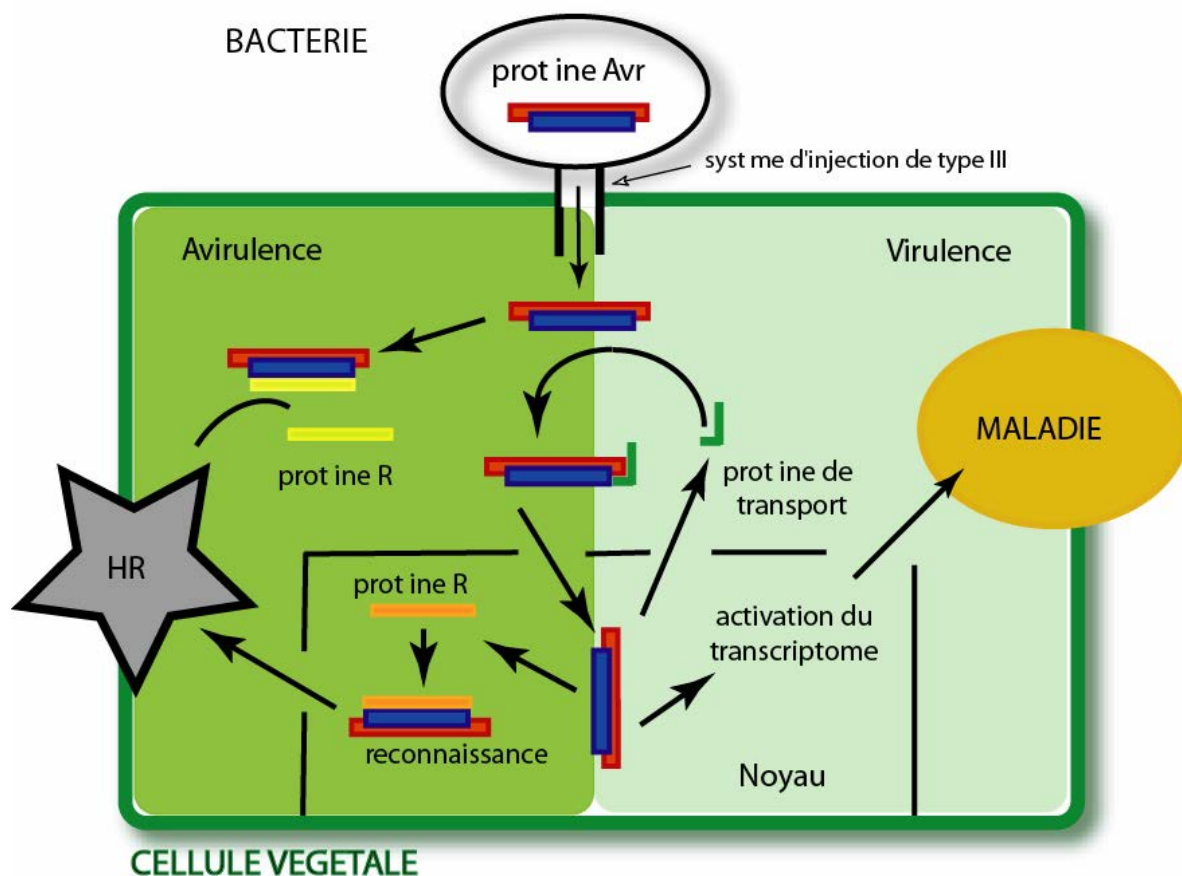


**Figure 5: Modèle de garde**

**A** : Résistance par interaction directe  
**B-1,2,3** : Résistance par interaction indirecte : le modèle de garde  
**C**: Protéine cible **P**: protéine helper

### 1.2.1. Les gènes d'avirulence (*Avr*)

De nombreux gènes d'avirulence ont été clonés chez les virus, les bactéries et les champignons (De Wit, 1997). La plupart des protéines *Avr* sont en fait des facteurs de virulence requis pour développer la maladie lorsque la plante ne possède pas les récepteurs nécessaires à la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène (Kjemtrup *et al.*, 2000). Cependant, chez des plantes résistantes, ces effecteurs sont reconnus par des protéines *R* et vont déclencher les mécanismes de la RH (Ellis *et al.*, 2000 ; Chisholm *et al.*, 2006). L'expression de gènes *Avr* chez des hôtes sensibles peut également provoquer des symptômes de la maladie identiques à ceux induits par l'agent infectieux (Figure 6) (Kjemtrup *et al.*, 2000).



**Figure 6 : Modèle concernant l'interaction entre les protéines (virulentes ou avirulentes) et la cellule végétale**

La protéine Avr est sécrétée dans la cellule végétale par un système de sécrétion de type III. La HR est induite suite à la reconnaissance spécifique entre les protéine R et Avr.

Le premier gène d'avirulence bactérien isolé et cloné a été le gène *AvrA* de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* race 6 (Staskawicz *et al.*, 1984). Ce gène induit l'hypersensibilité dans les cultivars de soja, portant le gène de résistance *Rpg2*. Depuis, plus de trente gènes *Avr* ont été isolés, aussi bien lors d'interactions avec des virus qu'avec des agents fongiques ou bactériens (Leach et White, 1996) du genre *Pseudomonas* et *Xanthomonas* (De Wit, 1992 ; Dangl, 1994 ; Bonas et Van den Ackerveken, 1997). Mais la fonction biologique de ces gènes n'est pas déterminée pour la plupart des agents pathogènes (Mansfield, 1997). Les gènes *Avr* bactériens codent, dans la plupart des cas, pour des protéines solubles intracellulaires contrairement à celles codées par les gènes de champignons qui sont extracellulaires. D'une manière générale, les gènes *Avr* codent soit pour des produits ayant une activité élicitrice directe des réponses de défense (Leach et White, 1996) tel le produit du gène *Avr9* (un peptide nommé AVR9) isolé du champignon *Cladosporium*



*fulvum* sur tomate et les protéines de la capsid du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT), soit pour des enzymes impliquées dans la synthèse de molécules élicitrices, comme *AvrD* de *Ps. syringae* qui code une enzyme impliquée dans la synthèse de dérivés lipidiques, les syringolides, responsable de l'induction d'une RH sur certains cultivars de soja. Chez *Ps. syringae*, plus de 40 effecteurs représentent des candidats pouvant être injectés dans les cellules des plantes hôtes (Alfano et Collmer, 2004). Les produits des deux gènes *Avr4* et *Avr9* induisent une RH 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).

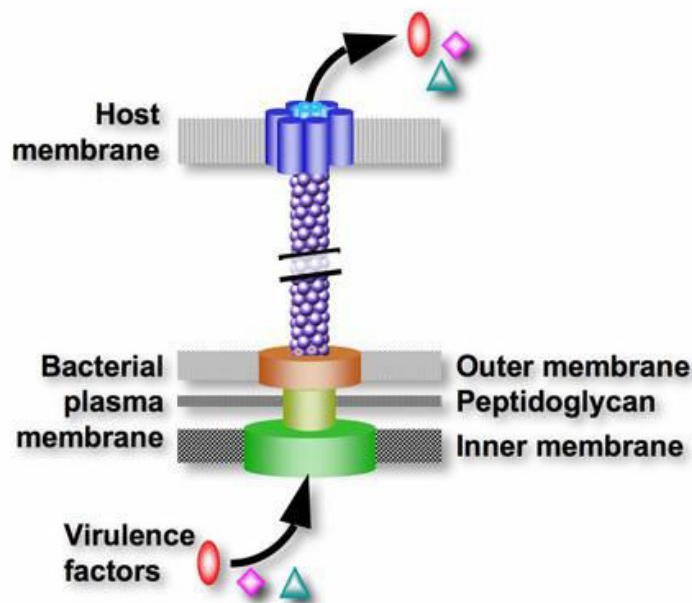


Figure 7 : représentation schématique du système de sécrétion de type III (TTSS)

Chez les bactéries, le fonctionnement des gènes *Avr* dépend de celui des gènes *hrp* (**h**ypersensitive **r**eaction and **p**athogenicity). La particularité des produits de gènes *Avr* est de ne pas posséder de peptide signal et donc de ne pas être sécrétés par les bactéries qui utilisent le système de transport de protéines chez la plante leur permettant de transpercer la paroi cellulaire et d'injecter dans les cellules les protéines effectrices qui seront reconnues par des protéines R. Ce système codé par les gènes *Hrp* (Lindgren *et al.*, 1986) est appelé système de sécrétion de type III (TTSS) (Figure 7), ou injectisome ; il a été mis en évidence chez *Yersinia* (Cornelis et Wolf-Watz, 1997). En effet, il faut que les produits *Avr* pénètrent à l'intérieur de la cellule végétale pour induire une RH (Leach et White, 1996 ; Hutcheson, 1998). Des mutants *hrp*, possédant des gènes *Avr* fonctionnels, sont incapables de déclencher une RH dans des cultivars possédant les gènes de

résistance correspondants (Gopolan et He, 1996). Cette machinerie protéique complexe, présente chez les bactéries Gram négatif, permet l'injection de protéines effectrices à travers la membrane des cellules cibles eucaryotes, il est composé d'au moins 20 protéines (Buttner et Bonas, 2006). Certaines protéines Avr possèdent des séquences consensus d'adressage vers des compartiments cellulaires particuliers: membrane cytoplasmique ou noyau cellulaire. La destruction de ces motifs d'adressage annihile la fonction d'avorulence (White *et al.*, 2000).

### 1.2.2. Les gènes de résistance

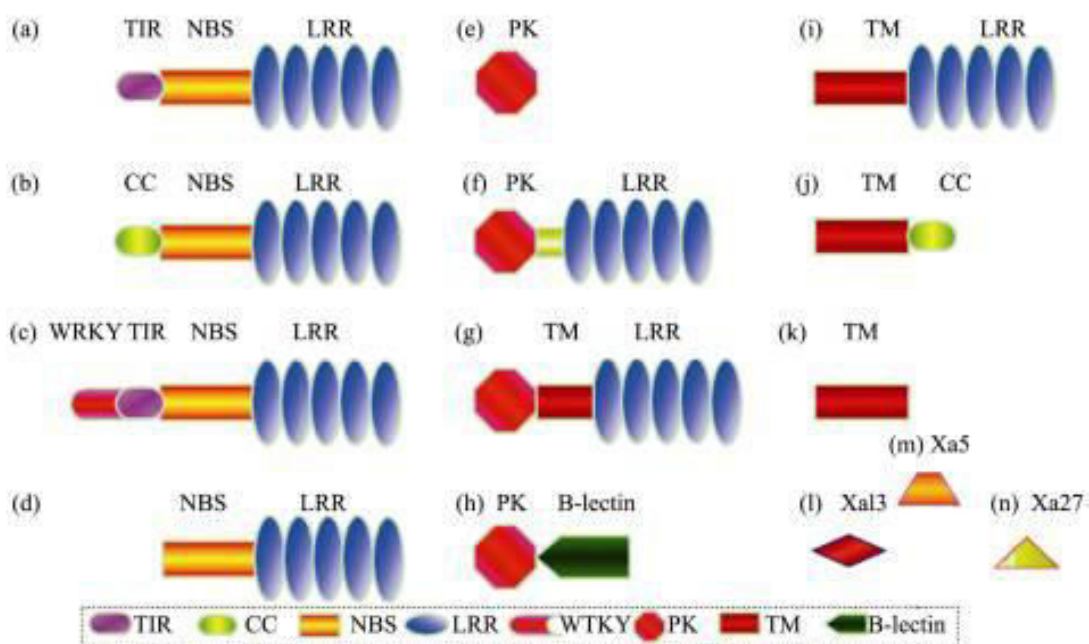
Depuis 1992, des gènes de résistance ont été clonés chez différentes espèces végétales (Annexe page 160). Cette avancée dans la compréhension des interactions plante/pathogène n'a été possible qu'après la généralisation des techniques de mutagenèse insertionnelle par transposons, en particulier par ceux du maïs, efficaces sur diverses espèces (maïs, tomate, tabac, lin, *Arabidopsis*) (Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Dinesh-Kumar *et al.*, 1995).

Le premier gène de résistance cloné a été le gène *Hm1* du maïs. Il confère la résistance vis-à-vis de *Cochliobolus carbonum* race 1. *Hm1* code pour une réductase impliquée dans la détoxification de la toxine HC de *C. carbonum* (Johal et Briggs, 1992). En 1993, Martin et ses collaborateurs ont cloné le gène de résistance *Pto* de la tomate qui confère la résistance vis-à-vis des races de *Ps. syringae* pv. *tomato* portant le gène *AvrPto*. Le gène *Pto* code pour une sérine-thréonine protéine kinase. La reconnaissance du ligand par le produit du gène *Pto* se traduirait par un signal secondaire de transduction (phosphorylation) activant les gènes de défense de la plante (Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Sessa et Martin, 2000).

Bien que les gènes de résistance (R) aient été isolés de différentes plantes et interagissent avec des gènes *Avr* de bactéries, de champignons ou de virus, ils présentent des régions analogues comprenant des séquences répétées riches en leucine (LRR), à l'exception du gène *Pto* de la tomate (Bent, 1996 ; Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Hutcheson, 1998 ; Martin, 1999). Ces motifs sont communs aux protéines végétales ou animales impliquées dans les interactions protéine-protéine (récepteurs), et dans des mécanismes de transduction (phosphorylation) (Hammond-Kosack et Jones, 1997). D'autres caractéristiques structurales permettent ensuite de définir plusieurs sous-groupes (Figure 8). Il s'agit de la présence dans la protéine de sites de liaison à des nucléotides (NBS), de domaine « leucine zipper » (LZ), de domaines sérine / thréonine kinase – LRR-Kinase) et de domaines Toll/interleukine-1 (TIR). Par exemple, le domaine TIR, comme son nom l'indique, présente des homologues de séquence avec le domaine cytoplasmique de la protéine Toll de la drosophile et le récepteur de l'interleukine-1 (IL-R) de mammifère. Les produits de gènes R possédant ce domaine pourraient être à l'origine d'une

cascade de signaux intracellulaires similaire à celle décrite pour Toll et IL-R chez les animaux (Hammond-Kosack et Jones, 1997; Sessa et Martin, 2000 ; Martin, 1999).

Les produits des gènes de résistance qui semblent être localisés dans le cytoplasme sont impliqués dans la reconnaissance de produits des gènes *Avr* viraux ou bactériens, dont l'activité nécessite une localisation intracellulaire (Hammond-Kosack et Jones, 1997) ou le seul membre de cette famille est le gène R *Xa21* (Wang *et al.*, 1998) qui code une protéine qui possède un domaine serine/thréonine kinase intracellulaire, conférant la résistance à une trentaine de souches de *Xanthomonas oryzae*. A l'opposé, les produits des gènes R trans-membranaires possédant un domaine LRR extracellulaire confèrent la résistance à des champignons se développant dans l'apoplasme où ils libèrent leurs facteurs *Avr*. C'est par exemple des produits des gènes de résistance *Cf2*, *Cf4*, *Cf5*, *Cf9* et des facteurs d'avirulence *Avr2*, *Avr4*, *Avr5*, *Avr9* dans l'interaction tomate/ *Cladosporium fulvum* (Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; van der Hoorn, 2005). Enfin, il apparaît aujourd'hui que le modèle gène pour gène requiert non seulement les déterminants R et Avr, mais également d'autres protéine-hôtes (Dixon *et al.*, 2000) s'associant au binôme R/Avr pour activer la défense ; l'appellation « résistosome » a été proposée pour ce complexe protéique (Lahaye et Bonas, 2001).



**Figure 8 : Représentation schématique des classes majeures de protéines de résistance connues.**

(**NBS**: nucleotide-binding site; **LRR**: leucine-rich repeat; **TIR**: Toll-interleukin-1 receptor; **CC**: coiled-coil; **TM**: transmembrane domain; **PK**: Protein Kinase; **WRKY**: WRKY domain; **B-lectin**: bulb-type mannose specific binding lectin domain) (d'après Liu *et al.*, 2007).

Le système de reconnaissance R/avr permet à la plante de reconnaître spécifiquement son agresseur et d'activer une cascade d'évènements qui vont lui permettre de résister. Dans le cas de l'interaction incompatible, les mécanismes de défense induits consécutivement à cette reconnaissance gène-gène vont conduire à la RH, une mort cellulaire programmée destinée à bloquer le développement de l'agression parasitaire.

## 2. La mort cellulaire hypersensible

Chez la plante, il existe un programme de mort cellulaire qui, inactivé dans les conditions normales, est induit sous l'effet d'une stimulation par un organisme pathogène. Elle a été décrite pour la première fois, il y a une centaine d'années, à partir d'observations réalisées sur le pathosystème blé-*Puccinia dispersa* (Ward, 1902). Le terme «Hypersensitive Reaction» est utilisé pour la première fois par Stakman (1915) pour dénoter la réponse de l'avoine, du seigle, du blé et l'orge à l'inoculation par le champignon *Pu. graminis*; il a observé une mort cellulaire rapide et anormale suite à l'attaque de certains cultivars par *Pu. graminis*. La mort cellulaire de type hypersensible se manifeste phénotypiquement par l'apparition de lésions nécrotiques localisées aux sites de pénétration de l'agent pathogène (Goodman et Novacky, 1994 ; Mur *et al.*, 2008).

La RH est un phénomène ubiquiste qui peut toucher tous les types de cellules ; elle joue un rôle important dans le développement et à la réponse au stress et permet l'élimination des cellules inutiles ou dangereuses pour l'organisme. Des travaux présentent des arguments qui suggèrent que la mort cellulaire de type hypersensible est génétiquement programmée (Greenberg *et al.*, 1994 ; Greenberg, 1996, 1997 ; Morel et Dangl, 1997). La RH nécessite la transcription de gènes et la traduction de gènes spécifiques démontrant qu'elle résulte d'un processus actif contrôlé génétiquement, et pas nécessairement de dommages dûs à l'agent pathogène. L'expression de certains transgènes conduit, dans certains cas, à l'induction d'une mort cellulaire semblable à celle de la RH.

L'une des approches développées pour identifier des gènes impliqués dans le contrôle et l'exécution de la mort cellulaire associée à la HR est l'utilisation de mutants dont ceux présentant spontanément des lésions de type HR (LMM, pour Lesion-Mimic Mutants), (Dangl *et al.*, 1996 ; Dietrich *et al.*, 1994 ; Greenberg *et al.*, 1994 ; Lorrain *et al.*, 2003). Ces mutants présentent des phénotypes différents, selon la cinétique d'apparition des lésions et la couleur ou la taille des lésions. Deux classes de LMM ont été identifiées, des mutants d'initiation et de propagation reposant sur l'idée que deux mécanismes différents sont impliqués dans la régulation de la mort cellulaire : un mécanisme contrôlant l'initiation de la mort cellulaire et un mécanisme régulant sa suppression.

L'identification des mutants *lsd* (lesion stimulating disease resistance response) (Dietrich *et al.*, 1994) et des mutants *acd* (accelerated cell death) (Greenberg *et al.*, 1994) d'*A. thaliana*, présentant spontanément des plages nécrotiques semblables à des RH sur toute la plante, milite en faveur de la présence d'une mort cellulaire génétiquement contrôlée. Chez ces mutants, il semblerait que l'étape de reconnaissance/stimulation ait été court-circuitée. Les réactions de défense sont déclenchées par une dérégulation d'une étape ne dépendant que de la plante. Dès que cette étape est franchie, la suite du programme de mort cellulaire est enclenchée et les lésions apparaissent. Bien que la mort soit souvent une réponse de défense observée dans les interactions plante/microorganisme pathogène, son rôle dans la résistance n'est cependant pas encore très clair. D'autres mutants *dnd1* (defense, no death) d'*A. thaliana*, ayant des flux de cations  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  perturbés, sont incapables d'activer la mort cellulaire hypersensible (Clough *et al.*, 2000). Cependant, ils sont toujours résistants à l'infection par une souche avirulente de *Ps. syringae*. En fait, ces mutants *dnd1* possèdent un niveau très élevé d'AS et expriment de manière constitutive des protéines PR. L'expression du gène *nabG* dans ces mutants *dnd1* entraîne la perte de la résistance vis-à-vis des souches virulentes ou avirulentes de *Pseudomonas* sans développer une mort cellulaire hypersensible. Ce travail montre que la mort cellulaire hypersensible n'est pas nécessaire au processus de résistance race/cultivar et suggère, en revanche, que l'expression des réponses de défense est suffisante pour que cette résistance s'établisse. Les travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui sur le suicide cellulaire ont conclu qu'il existe des gènes dont la présence permet le contrôle de la vie et de la mort des cellules. Ces gènes permettent aux cellules de fabriquer des molécules qui interagissent entre elles. Parmi elles, des composés toxiques comme les ROS (Heath, 2000), ainsi que des nucléases et des cystéines ou sérine-protéases sont directement impliquées dans les mécanismes d'exécution du programme de mort cellulaire (Fukuda, 2000 ; Heath, 2000).

L'apoptose de la cellule animale est une forme particulière de mort cellulaire programmée, distincte de la nécrose, au cours de laquelle une cascade d'événements se met en place dans les différents compartiments des cellules pour conduire à des changements structuraux caractéristiques (Kerr *et al.*, 1972). Lors de l'apoptose, la membrane plasmique s'invagine, le noyau et le cytoplasme se condensent, des corps apoptotiques qui correspondent à des vésicules membranaires contenant des fragments d'acide nucléique se forment, l'ADN se segmente en fragments de grande taille d'environ 50 kb et/ou de petite taille correspondant à la zone internucléosomale (180 à 200 pb) dont l'extrémité 3'OH libre implique l'intervention d'une endonucléase (DNA laddering) (Heath, 1998 ; Greenberg, 1996, 1997 ; Drew *et al.*, 2000). Une ou plusieurs de ces caractéristiques morphologiques apparaissent lors de la RH mise en place par la plante pour confiner l'agent pathogène à son site de pénétration. Ainsi, des protoplastés de

tomate traités par un éliciteur lipidique, l'acide arachidonique, qui permet de développer une RH, montrent une fragmentation de l'ADN en multiples éléments dont les extrémités sont 3'OH libres (Greenberg, 1997). De plus, sur des cultures cellulaires de soja ou sur des tissus d'*A. thaliana*, l'infection par des bactéries avirulentes entraîne l'apparition de fragments d'ADN de grande taille et de formes semblables à des corps apoptotiques (Levine *et al.*, 1996). Une fragmentation de l'ADN nucléaire et l'induction d'endonucléases spécifiques ont aussi été observées dans les cellules de tabac au cours de la RH contre le VMT (Mittler et Lam, 1995). Ainsi, un clivage de l'ADN nucléaire en nucléosomes a été observé au cours de l'interaction incompatible entre la dolique et le champignon *Uromyces vignae*. Enfin, le traitement des plantes de pois par un éliciteur fongique ou par le cyanure de potassium (KCN) favorise la fragmentation de l'ADN (Greenberg, 1997). L'ensemble de ces observations montre que la mort cellulaire de type hypersensible chez les plantes présente certaines caractéristiques de l'apoptose chez les animaux. Il semble qu'il existe des mécanismes similaires qui pourraient gouverner le phénomène de mort cellulaire programmée chez les plantes et les animaux (Ameisen, 1999).

De nombreuses données indiquent que les ROS participent à l'induction de la mort cellulaire tant chez la cellule végétale que chez la cellule animale (Breusegem et Dat, 2006). Des résultats montrent que les ROS sont impliquées dans la mort cellulaire hypersensible chez les végétaux (Zaninotto *et al.*, 2006). Au cours de la RH induite sur des cultures cellulaires de soja infectées par une race avirulente de *Ps. syringae*, le taux de cellules mortes a fortement augmenté lorsque l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est accrue en présence d'aminotriazole (un inhibiteur de catalase) (Levine *et al.*, 1994). Ainsi, l'addition aux suspensions cellulaires de soja d'un inhibiteur des protéines kinases comme K252A et la staurosporine, bloque entièrement le choc oxydant induit par l'éliciteur Pmg, un glucan issu de champignon *P. megasperma f. sp. glycinea*, mais sans inhiber totalement la mort cellulaire induite par la bactérie avirulente (Levine *et al.*, 1994). De plus, au cours de l'interaction tabac/VMT, la mort cellulaire de type hypersensible est fortement corrélée à une diminution de l'expression d'une ascorbate peroxydase, une enzyme impliquée dans la détoxification des ROS (Mittler *et al.*, 1998). L'implication de ces ROS dans les réactions de défense et de mort cellulaire *in vivo* a été démontrée grâce à des mutants et des plantes transgéniques (Torres *et al.*, 2006). Chez *Arabidopsis*, le gène *lsd1* coderait pour une protéine en « doigt de zinc » fonctionnant comme un régulateur négatif de la mort cellulaire végétale (Dietrich *et al.*, 1997). De manière intéressante, les mutants *lsd1* sont incapables de détoxifier O<sub>2</sub><sup>-</sup> produit par des feuilles élicitées. L'infiltration de DPI (diphénylène iodonium) dans ces feuilles permet à nouveau de contrôler la progression de la RH (Jabs *et al.*, 1996). Ces auteurs suggèrent que O<sub>2</sub><sup>-</sup> serait l'élément nécessaire au développement de la RH et donc de la mort cellulaire. Ainsi,

l'expression d'un transgène codant pour une enzyme produisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la pomme de terre, induit une résistance à différents microorganismes pathogènes (Wu *et al.*, 1995). Par ailleurs, des plants de tabac n'exprimant plus la catalase Cat1 présentent des lésions nécrotiques de type RH (Chamnonpol *et al.*, 1996). Chez les plantes, la mort cellulaire programmée semble donc être associée aux ROS (Montillet *et al.*, 2005 ; Van Breusegem and Dat, 2006) aux fonctions variables avec les peroxysomes, les mitochondries et les chloroplastes comme organites sources.

Chez les mammifères, des protéines de la famille Bcl-2 (**B-cell lymphoma-2**) sont fortement impliquées dans la régulation de l'apoptose. La surexpression de Bcl-2 supprime complètement la peroxydation des lipides et protège des lymphocytes d'homme et de souris de l'apoptose induite par l'application des hydroperoxydes lipidiques ou du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sandstrom *et al.*, 1995 ; Hockenbery *et al.*, 1993). L'expression d'un activateur de l'apoptose (Mitochondria-targeted Bax triggered cell death) chez le tabac induit des lésions semblables aux lésions RH (Jones, 2000). Chez les animaux, les cystéines protéases, encore nommées caspases, sont impliquées dans l'exécution de l'apoptose (Zhang *et al.*, 2000).. En utilisant des oligopeptides synthétiques, «substrats» des caspases, et des inhibiteurs de caspases, des activités de type caspase ont pu être mises en évidence chez les plantes (Bozhkov *et al.*, 2004). Une activité de type caspase a été détectée au cours de la RH de tabac en réponse au VMT (del Pozo et Lam, 1998). Des recherches ont mis en évidence l'existence de deux familles présentant des activités de type caspase (Uren *et al.*, 2000) : les paracaspases, présentes chez les animaux (Yu et Lenardo, 2003), et les métacaspases, présentes chez les plantes (Watanabe et Lam, 2005). L'utilisation des inhibiteurs spécifiques de caspases sur des cultures cellulaires de soja, montrent que l'utilisation des inhibiteurs de cystéine-protéases inhibe la mort cellulaire induite par l'application du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou par une souche avirulente de *Ps. syringae* pv. *glycinea* (Solomon *et al.*, 1999). L'ensemble de ces observations peut indiquer qu'il existe certaines similitudes entre l'apoptose chez les animaux et la mort cellulaire hypersensible chez les végétaux, même si le débat est loin d'être clos (Mur *et al.*, 2008).

### 3. Transduction du signal intracellulaire

En aval de la perception de l'agent pathogène ou de l'éliciteur *via* un récepteur potentiel, se mettent en place des étapes de signalisation intracellulaire extrêmement complexes (Figure 9). Cette cascade de transduction du signal conduisant à la RH est associée à des modifications biochimiques, cellulaires et moléculaires, et fait intervenir, entre-autres, des protéines G (GTP-binding protein), des flux ioniques, des cascades de phosphorylation / déphosphorylation, des

formes réactives d'oxygène (ROS) et le monoxyde d'azote (NO). Dans cette introduction ne seront abordés que les mécanismes oxydatifs associés aux ROS

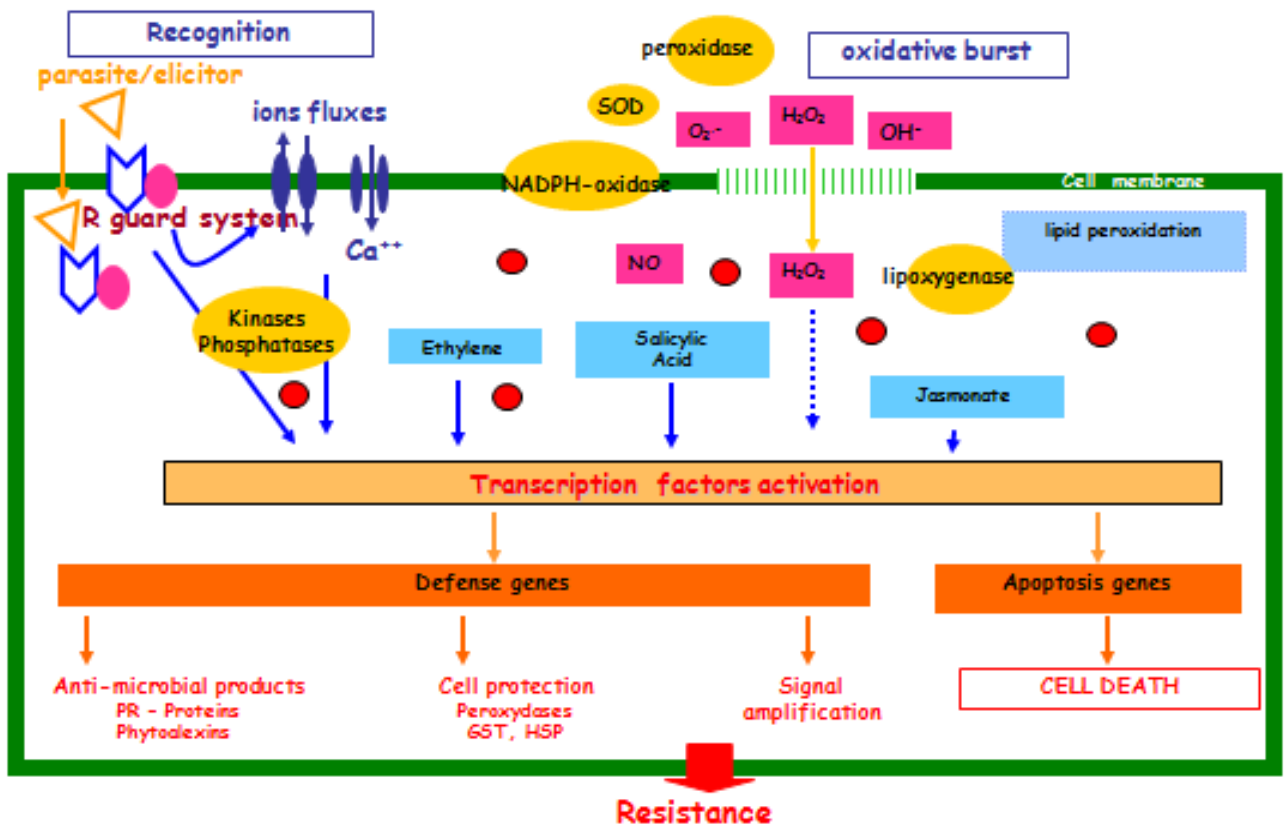


Figure 9 : Transduction du signal intracellulaire

### 3. 1. Les formes réactives de l'oxygène

L'oxygène est à l'origine des ROS formées par sa réduction séquentielle. Ces ROS incluent principalement l'oxygène singlet ( $^1O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^\ominus$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) (Figure 10). Dans la littérature, différents termes sont utilisés : Espèces Actives de l'oxygène (Active Oxygen Species, AOS), Espèces Réduites d'Oxygène (Reduced Oxygen Species, ROS) Intermédiaires Actifs d'Oxygène (Active Oxygen Intermediates, AOI), Oxygène Actif (Active Oxygen, AO), Intermédiaires Réactifs d'Oxygène (Reactive Oxygen Intermediates, ROI), ou encore Espèces Réactive d'Oxygène, (Reactive Oxygen Species, ROS). Toutes ces descriptions reflètent la complexité et les potentialités diverses de ces molécules. Pour désigner ces composés, nous utiliserons l'abréviation ROS ou le terme radicaux libres, bien qu'il ne s'agisse pas uniquement de radicaux du point de vue chimique. Les ROS sont produites en faible quantité au cours du métabolisme normal de tout organisme aérobie par le système de transport d'électrons tels les chloroplastes (photosynthèse) et les mitochondries (respiration) ou lors de processus enzymatiques (Del Rio *et al.*, 1992 ; Asada,

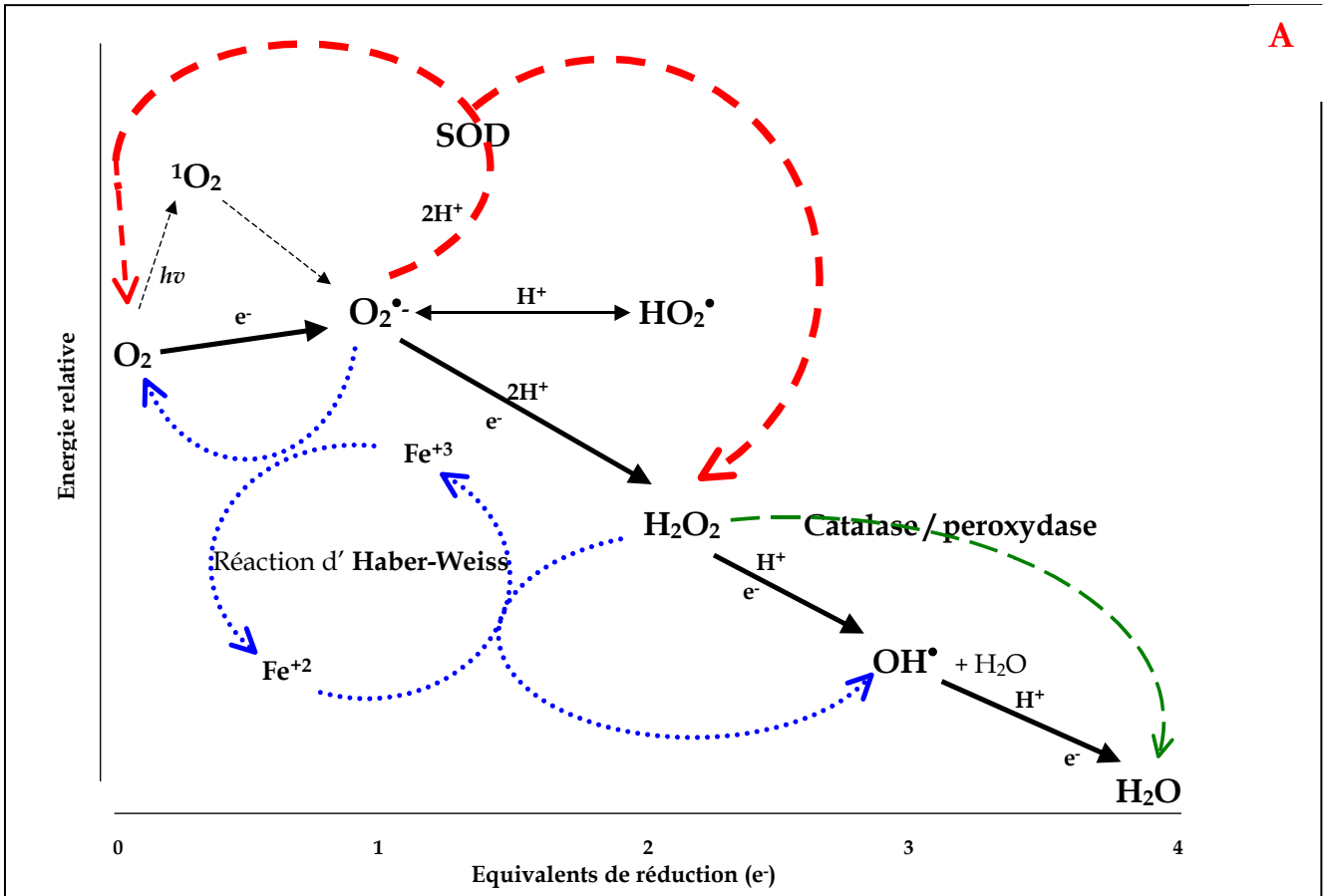


1994 ; Allen, 1995). Elles sont utiles à l'organisme à doses modérées, mais toxiques à haute dose. L'organisme va alors se protéger par divers systèmes antioxydants enzymatiques (SOD, catalase, peroxydase, glutathion transférase) ou non enzymatiques en produisant de l'acide ascorbique et/ou du glutathion (Foyer, 1993). Dans ce sens, le rôle des glucosyltransférases a été récemment étudié (Chong *et al.*, 1999). L'équilibre entre la production et l'élimination des ROS constitue le stress oxydant, très largement documenté dans les interactions plantes /pathogènes (Lamb et Dixon, 1997 ; Low et Merida, 1996 ; Wojtaszek, 1997). Dans certaines circonstances particulières que nous détaillerons ultérieurement, ces formes très réactives s'accumulent et peuvent être à l'origine de nombreux événements qui aboutissent à l'altération de l'architecture cellulaire, voire à la mort. Cet aspect néfaste fait cependant trop souvent oublier le rôle joué par les ROS dans la signalisation cellulaire (Bailey-Serres et Mittler, 2006 ; Parent *et al.*, 2008).

### **3.2. La réduction séquentielle de l'oxygène et les systèmes impliqués dans la production des ROS**

L'oxygène représente aujourd'hui 21% de l'atmosphère terrestre. Les végétaux chlorophylliens, terrestres ou aquatiques, assurent sa production à partir de la molécule d'eau, tous les organismes vivants utilisent cet oxygène dans un processus de production d'énergie au cours de la respiration. En effet, la formation de molécules hautement énergétiques comme l'ATP est fortement liée à une chaîne de transporteurs qui transfère des électrons de molécules biologiques réduites vers un accepteur final : l'oxygène. Pourtant, une réduction incomplète de l'oxygène moléculaire est possible. L'oxygène moléculaire est relativement non toxique et non réactif, sa réduction séquentielle mono-électronique conduit à la formation des ROS (Figure 10). Les ROS, ou les radicaux libres, sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possède un électron célibataire (ou non apparié). Le champ magnétique créé par sa rotation n'est donc pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules produisant de nouveaux radicaux libres de type peroxydasique extrêmement réactifs. Le radical hydroxyle est généré par une réaction non enzymatique, la réaction de Haber-Weiss, qui fait intervenir des métaux de transition tels que le  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ . Les ROS sont produits par un grand nombre de mécanismes programmés par l'organisme à des fins de défense ou de signalisation.

A



Superoxyde/hydroperoxyl Equivalent:  $\text{O}_2^{\circ-} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HO}_2^{\circ}$  (pKa = 4,8)

Dismutation:  $\text{HO}_2^{\circ} + \text{O}_2^{\circ-} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$  ( $K = 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$\text{O}_2^{\circ-} + \text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$  ( $K = 0,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$\text{O}_2^{\circ-} + \text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$  ( $K = 0,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\circ-} \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$

Réaction de Fenton

$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^{\circ} + \text{OH}^-$

Réaction d'Haber-Weiss

$\text{O}_2^{\circ-} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{OH}^{\circ} + \text{OH}^- + \text{O}_2$

B

Figure 10 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)  
(d'après Baker et Orlandi, 1995).

A : Réactions d'interconversion.

B : Equations chimiques associées aux ROS.

La production des ROS a été mise en évidence pour la première fois par Doke (1983a,b) lors de la RH sur des tissus de tubercule de pomme de terre infectés par une race incompatible de *P. infestans*. Depuis, de nombreuses études ont montré que les ROS sont induites par des agents pathogènes (Martínez *et al.*, 1998 ; Mehdy, 1994 ; Wojtaszek, 1997 ; Simon-Plas *et al.*, 1997) ainsi que par des éliciteurs de toute nature (Lamb et Dixon, 1997 ; May *et al.*, 1996 ; Pugin *et al.*, 1997). L'évolution de la cinétique de production de ROS après la mise en contact de cellules végétales avec un microorganisme pathogène est différente selon qu'il s'agisse d'une interaction compatible ou incompatible. Dans le cas de l'interaction compatible, une production transitoire de ROS peut avoir lieu quelques minutes après le contact des deux partenaires (appelée phase I) suivie d'une baisse irréversible. Dans le cas de l'interaction incompatible, deux phases ont été observées : une première phase identique à celle de l'interaction compatible est suivie quelques heures plus tard d'une deuxième phase de production de ROS (appelée phase II). La deuxième phase est caractéristique des situations incompatibles, elle coïncide avec un phénomène d'échange d'ions à travers la membrane cytoplasmique notamment un efflux d'ions  $K^+$  et un influx d'ions  $H^+$  et conduit à la mort cellulaire quelques heures plus tard (Baker *et al.*, 1993 ; Chandra *et al.*, 1996b ; Levine *et al.*, 1994 ; Keppler *et al.*, 1989 ; Draper, 1997). La phase I de production de ROS est non spécifique. Par contre, la phase II nécessite l'action des gènes *hrp* dans la résistance non-hôte et l'action des gènes *Avr* dans la résistance spécifique race/cultivar (Glazener *et al.*, 1996, Lamb et Dixon, 1997). Dans des suspensions cellulaires de tomate infectées par *Ps. syringae* pv. *tomato*, la phase II de production de ROS est induite uniquement lorsque *Pto* et *AvrPto* sont présents dans les organismes correspondants (Chandra *et al.*, 1996b). La phase II du burst oxydatif semble donc reliée au phénomène de résistance.

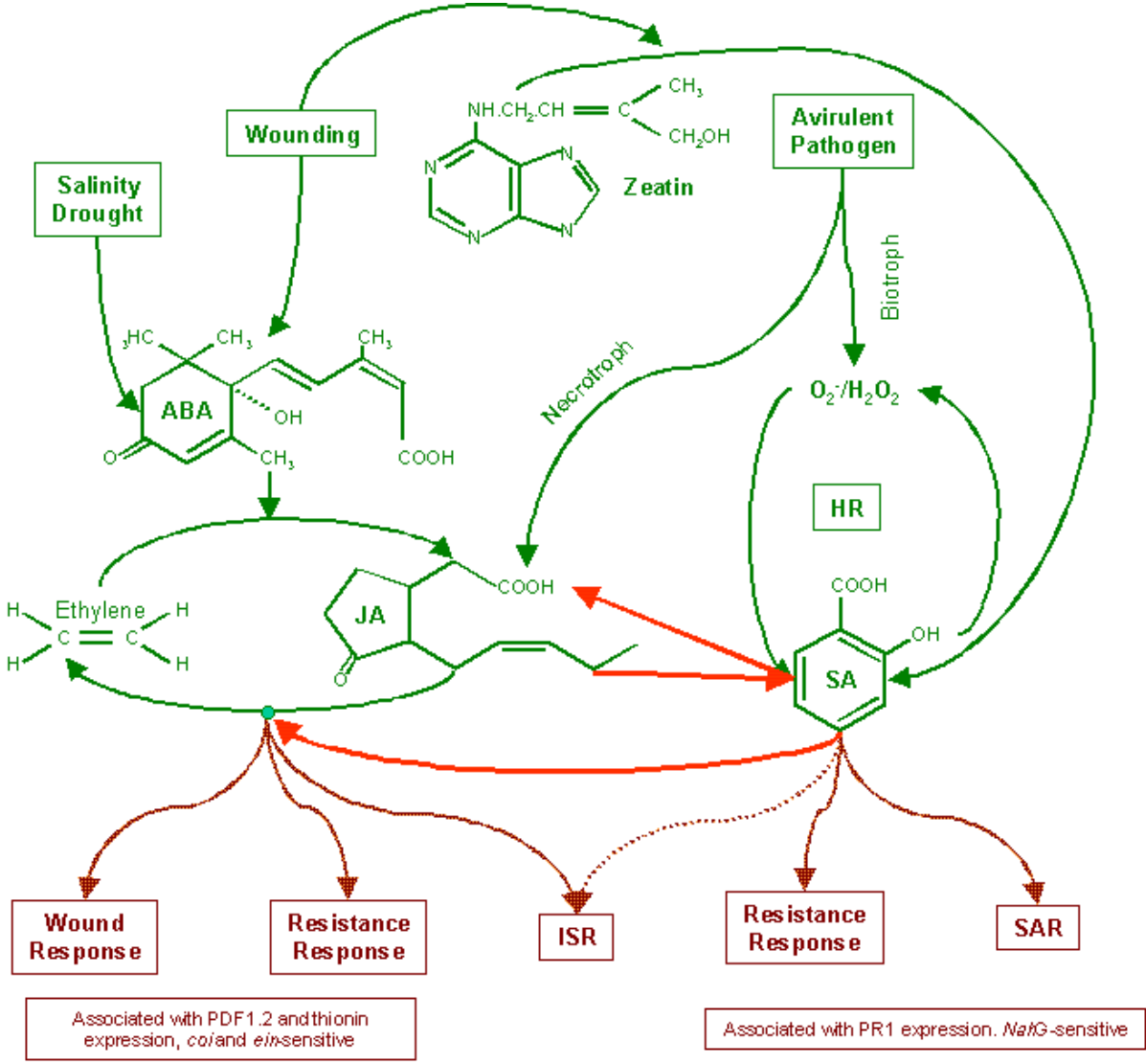
Plusieurs enzymes sont aptes à générer les ROS au cours des interactions plantes/pathogènes (Bolwell et Wojtaszek, 1997) soit en tant qu'intermédiaire dans une suite de réactions, soit en tant que produit final de réactions contrôlées par les NAD(P)H-oxydases, glucose oxydases, oxalate oxydases ou certaines peroxydases. Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont montré l'activation du complexe de la NAD(P)H oxydase capable d'utiliser de l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d' $O_2^{\circ}$  au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules végétales (Keller *et al.*, 1998 ; Groom *et al.*, 1996). Sur différents modèles, des protéines végétales sont reconnues par des anticorps dirigés soit contre des sous-unités régulatrices du complexe oxydase des neutrophiles humains comme p47<sup>phox</sup> (phox pour le terme de « phagocyte oxydase »), p67<sup>phox</sup> (Dwyer *et al.*, 1996 ; Desikan *et al.*, 1996) ou une petite protéine G (Rac 2) (Kieffer *et al.*, 1997), soit contre une sous-unité constitutive de ce complexe (p22<sup>phox</sup>) (Levine *et al.*, 1994). Les gènes codant pour des homologues à la sous-unité

gp91<sup>phox</sup> de NADPH oxydases de mammifères ont maintenant été clonés chez le riz et *Arabidopsis* (Groom *et al.*, 1996 ; Keller *et al.*, 1998). Ces résultats, ajoutés aux parentés immunologiques entre les systèmes d'oxydases dans les neutrophiles et les cellules de plantes, suggèrent une similarité entre les mammifères et les plantes dans les processus de défense contre les microorganismes pathogènes (Levine *et al.*, 1994 ; Groom *et al.*, 1996). L'inhibition de l'activité des NAD(P)H oxydases par un inhibiteur suicide des NAD(P)H oxydases de mammifères comme le (DPI) empêche la production des ROS après élicitation dans plusieurs systèmes végétaux (Bolwell *et al.*, 1998 ; Levine *et al.*, 1994 ; Simon-Plas *et al.*, 1997). Les ROS sont aussi produites par des peroxydases pariétales (Bolwell et Wojtaszek, 1997). Ainsi, des cotylédons de cotonniers infectés par une race incompatible de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*) génèrent un burst oxydatif extracellulaire grâce à une NADH peroxydase cationique apoplastique (Martinez *et al.*, 1998). Cette observation est confortée par le fait qu'un gène de peroxydase de cotonnier, *GhPod4*, présente une transcription précoce et plus importante dans le cas d'une interaction incompatible (Delannoy *et al.*, 2003, 2006). Cependant, sur des cellules de haricot, une partie de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par un éliciteur issu de *Colletotrichum lindemuthianum* est inhibée par la présence de cyanure de potassium (KCN) alors que les NADPH oxydases sont insensibles à ce composé (Lamb et Dixon, 1997). Sur le même matériel végétal, il a été mis en évidence une peroxydase cationique de 46 KDa localisée dans la paroi des cellules capables de produire H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bolwell *et al.*, 1995). Il faut également signaler qu'il existe d'autres systèmes de production des ROS comme chez l'orge où une oxalate oxydase est responsable de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wojtaszek, 1997). Enfin, une lipoxygénase a aussi été proposée comme producteur des ROS (Roy *et al.*, 1994), mais il a été récemment mis en évidence que l'activation de cette enzyme est postérieure à la production des ROS (Rosahl, 1996).

#### **4. Transduction du signal intercellulaire**

L'un des événements liés à la réaction hypersensible est la production de molécules qui serviraient de signaux pour activer les défenses des cellules voisines ou distantes de la zone d'infection. Cette notion de transduction du signal intercellulaire repose pour beaucoup sur des molécules « signal » comme les hormones tels l'acide salicylique (SA), l'éthylène, l'acide abscissique (ABA) ou l'acide jasmonique (JA) (Figure 11). Dans le cas de la LAR (Local Acquired Resistance) et de la SAR (Systemic Acquired Resistance) (Mur *et al.*, 1996), le SA est un élément clé de leur installation. Il a été proposé que les tissus concernés par la LAR pourraient être la zone de production des signaux nécessaires à l'établissement de la SAR (Dorey *et al.*, 1997). Le JA, un octadécanoïde de la famille des oxylipines, joue également un rôle déterminant dans la

résistance des plantes aux parasites. Dans cette partie de mon chapitre, je ne détaillerai que le rôle du JA et des interconnexions avec les autres voies de signalisation.



**Figure 11 : Transduction du signal intercellulaire**  
 Les hormones (AJ, AS, ET, et ABA) impliquées dans la régulation des processus liés à des stress biotiques et abiotiques

#### 4.1. L'acide jasmonique

Cet acide 12-oxo phytodiénoïque est un dérivé cyclique produit à partir de 13-(*S*)-hydroperoxyde de l'acide linoléique (C18 :3) par l'action séquentielle de nombreuses enzymes. Ainsi, le 13 (*S*) hydroperoxyde lipidique produit à partir d'une activité 13-LOX est cyclisé avant de subir trois étapes de  $\beta$ -oxydation pour diminuer la longueur de sa chaîne carbonée (Sembdner et Parthier, 1993 ; Simpson et Gardner, 1995 ; Leon et Sanchez-Serrano, 1999). Cette synthèse est analogue à celle observée chez l'animal, lors de la production des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (C20 :4). L'AJ est le produit final d'une des voies de synthèse des oxylipines, la voie des octadécanoïdes (Figure 12).

L'AJ et son ester méthylé, le MeJA, une molécule volatile, ne sont pas seulement impliqués dans la croissance et le développement de la plante (Pauwels *et al.*, 2009) mais également dans la signalisation aboutissant à des réponses de défense (Wasternack et Parthier, 1997 ; Kazan et Manners, 2008). Il a été montré que l'AJ s'accumule précocement au site d'infection du VMT chez le tabac (Kenton *et al.*, 1999), après blessures chez le tomate (Creelman *et al.*, 1992) ou après traitement des cultures cellulaires de soja et de tabac avec des éliciteurs (Gundlach *et al.*, 1992 ; Rickauer *et al.*, 1997). L'AJ et le MeJA interviennent dans l'expression locale et systémique d'inhibiteurs de protéases dans les feuilles de tomates en réponse à la blessure (Farmer et Ryan, 1990). De plus, l'addition exogène de l'acide jasmonique se traduit par l'activation des gènes codant pour la PAL, la CHS chez des cultures cellulaires de soja et de tabac (Creelman *et al.*, 1992 ; Gundlach *et al.*, 1992 ; Sharan *et al.*, 1998), la production de peptides ou protéines antifongiques défensives chez *Arabidopsis* (Penninckx *et al.*, 1996), l'expression d'une osmotine (PR-5) chez le tabac (Xu *et al.*, 1994), la stimulation de LOX dans plusieurs systèmes végétaux (Avdiushko *et al.*, 1995 ; Melan *et al.*, 1993 ; Véronési *et al.*, 1996 ; 1999 ; Rustérucchi *et al.*, 1999 ; Weichert *et al.*, 1999 ; Schenk *et al.*, 2000) ou la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez la tomate *via* d'une activité NADPH-oxydase (Orozco-Cardenas et Ryan, 1999 ; Orozco-Cardenas *et al.*, 2001). Des mutants d'*Arabidopsis* qui ne peuvent pas accumuler l'AJ sont extrêmement sensibles à l'infection par un *Pythium* (Vijayan *et al.*, 1998). L'application exogène d'AJ permet de réduire significativement cette sensibilité. L'AJ semble donc directement impliqué dans ce cas de défense chez *Arabidopsis*. Le pré-traitement des plants de pomme de terre par l'AJ augmente leur résistance vis-à-vis de *P. infestans* (Cohen *et al.*, 1993). Récemment, une autre approche confirmant l'importance de l'AJ dans la résistance a consisté à produire l'AJ de manière constitutive chez *Arabidopsis* (Ellis et Turner, 2001). Ces plantes transgéniques présentent une résistance très efficace à des souches de mildiou. Le rôle de l'AJ et du MeJA comme molécule signal dans la défense semble toutefois dépendre de l'espèce végétale et de la nature des réponses étudiées. Par exemple, chez le riz, l'AJ ne semble pas nécessaire pour l'induction de gènes de protéines PR et

l'établissement d'une résistance locale (Schweizer *et al.*, 1997). De plus, des tabacs transgéniques n'exprimant pas la WIP kinase n'accumulent pas d'AJ après blessures, alors qu'une surexpression de cette kinase induit une augmentation du taux endogène d'AJ (Seo *et al.*, 1999). Ceci suggère qu'un mécanisme de phosphorylation est également impliqué dans la voie de signalisation de l'AJ lors de la blessure.

Un modèle impliquant l'AJ et le MeJA dans les réponses à l'attaque par des insectes et des agents pathogènes a été proposé (Farmer *et al.*, 1992 ; Farmer et Ryan, 1992). La blessure provoquée par un insecte herbivore ou l'infection par un micro-organisme conduirait à la production de molécules spécifiques, telles que la systémine ou des oligogalacturonides pariétaux qui activeraient une lipase. Cette lipase libérerait de la membrane plasmique de l'acide linoléique qui serait converti en AJ via des LOX. L'AJ stimulerait ensuite l'expression des gènes de défense. Des phospholipases sont effectivement activées après élicitation de suspensions cellulaires de soja (Chandra *et al.*, 1996a) ou de tabac (Roy *et al.*, 1995), et après blessures chez *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2000). Une enzyme avec une activité phospholipase A2 a été isolée chez le tabac infecté par le VMT (Dhont *et al.*, 2000). Une forte stimulation de cette activité phospholipase précède une augmentation des quantités d'AJ. Chez *Arabidopsis* un gène codant pour une JMT (*J*-adenosyl-L-méthionine : jasmonic acid carboxyl methyltransferase, enzyme qui catalyse la transformation de l'AJ en MeJA) a été isolé (Seo *et al.*, 2001). Cette étude montre, en utilisant des plants transgéniques d'*Arabidopsis* surproduisant du MeJA, que la *JMT* joue un rôle essentiel dans la régulation des réponses spécifiques aux microorganismes. Ces plantes montrent une résistance très efficace vis-à-vis des souches virulentes de *B. cinerea*. Ce travail suggère que l'activation de l'expression de *JMT* conduit à la production de MeJA qui réagit comme régulateur intra- et inter-cellulaire, et comme messenger volatile assurant la communication intra- et inter-plantes.

Le développement de mutants *coi* (*coronative insensitive1*) chez *Arabidopsis*, qui présentent des déficiences de certains mécanismes jasmonate-dépendants, *jar1* (*jasmonate resistant 1*) et *jin1* (*jasmonate insensitive1*) a permis de lever un voile partiel sur la complexité de la voie de l'AJ. Les récepteurs cellulaires de l'AJ et de ses dérivés sont en fait très diversifiés traduisant le potentiel de réponse des plantes à différents stimuli endogènes ou exogènes. La voie de signalisation de l'AJ se distingue aussi par son aptitude à s'autoréguler ; les gènes de la voie de biosynthèse de l'AJ peuvent ainsi être activés par les JAs, suggérant un rétrocontrôle positif impliquant, entre autres, les canaux calciques (Bonaventure *et al.*, 2007). Malgré les progrès récents quant à la fonction de l'AJ dans la résistance des plantes aux agressions parasitaires, la connaissance des fondements moléculaires des mécanismes de régulation que contrôle cette molécule demeure encore très fragmentaire et constitue un terrain d'investigations très fertile (Katsir *et al.*, 2008). Dans cette

optique, l'analyse des mutants *jaz* (*jasmonate ZIM domain* : domaines codant des protéines qui répriment l'expression des gènes sensibles à l'AJ) permettra d'améliorer la compréhension du rôle de l'AJ.

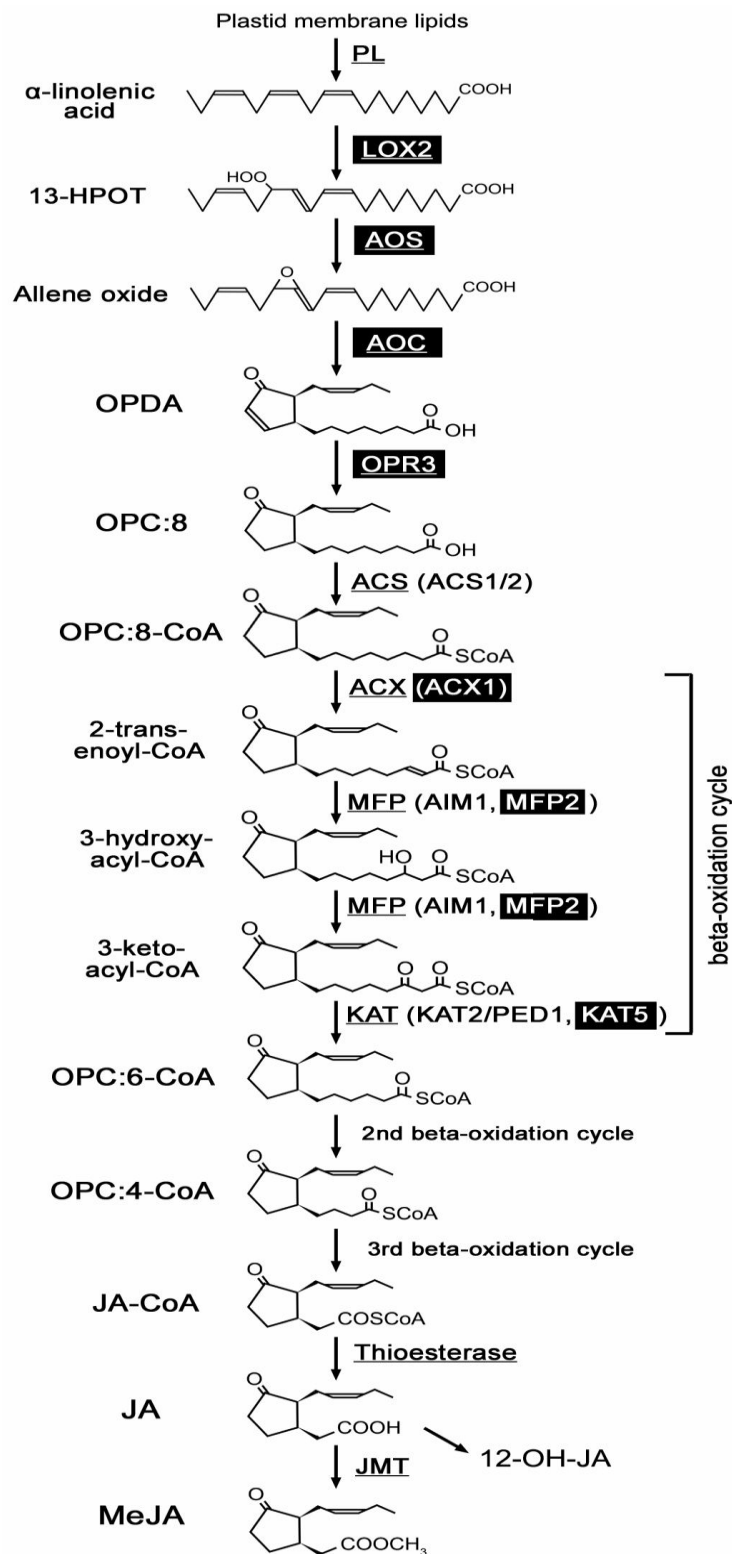


Figure 12: Représentation schématique de la voie des octadécanoïdes conduisant à la synthèse de l'AJ. L'expression des gènes codant les enzymes surlignées en noir sont régulées par l'AJ chez *Arabidopsis*.



#### 4.2. Interconnexion des différentes voies de signalisation

Dans son écosystème de prédilection, une plante est sujette à des contraintes biotiques et abiotiques simultanées. Soumise à des attaques multiples, elle devra actionner l'ensemble des leviers à sa disposition pour optimiser ses stratégies de défense à un moindre coût en favorisant la communication entre les voies hormonales (crosstalk) (Figure 13). Les approches pharmacologiques et l'utilisation des différents mutants ont révélé la multiplicité et la diversité des interconnexions entre les voies de transduction du signal, traduisant les capacités adaptatives puissantes de la plante à un environnement hostile.

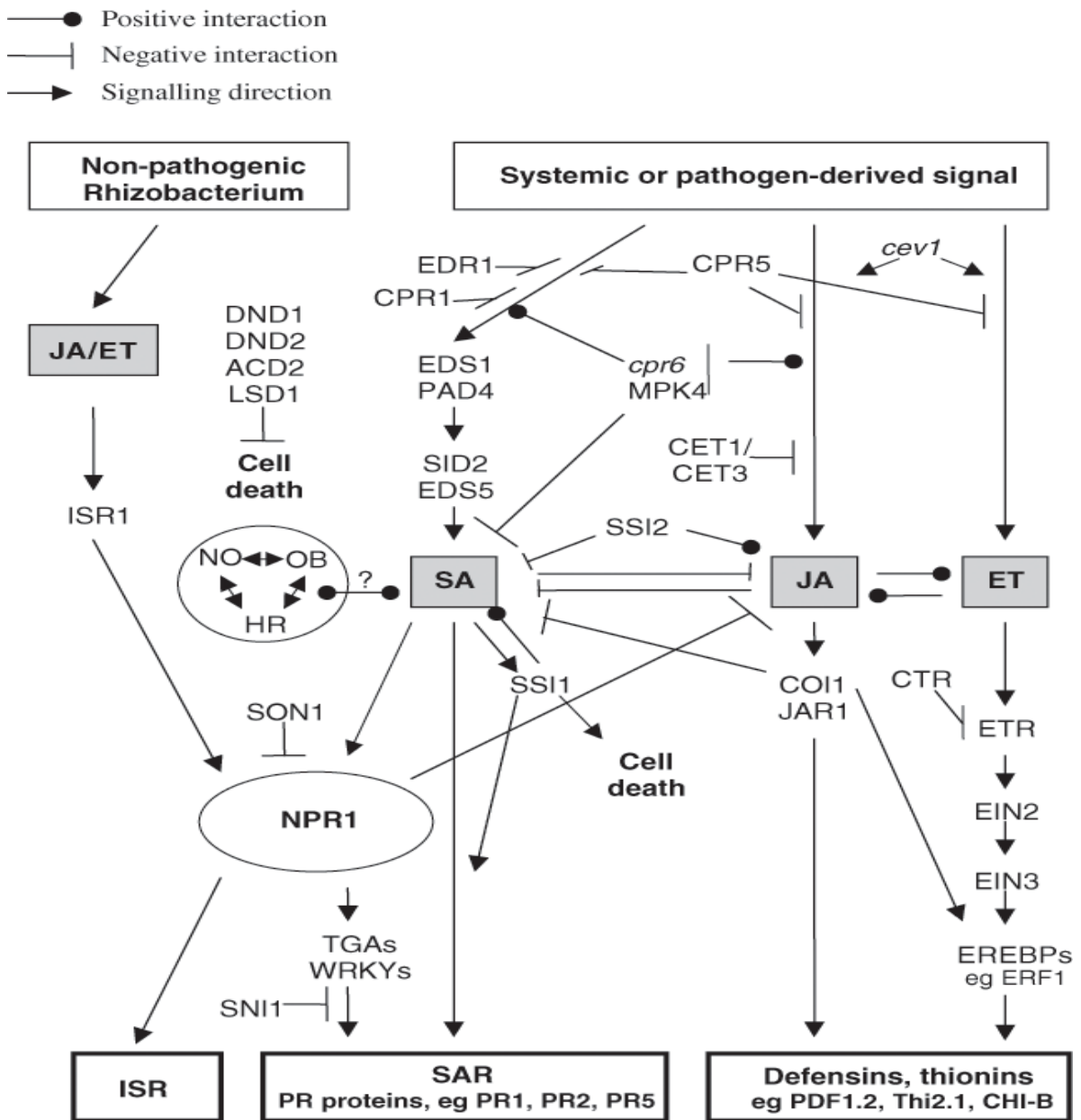


Figure 13 : Interactions hormonales suite à un stress biotique ou infection par une bactérie non pathogène

#### 4.2.1. Phénomène de potentialisation

Le phénomène de potentialisation est un exemple de coopération dans les systèmes de signalisation impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Beckers et Conrath, 2007). Il y a potentialisation lorsqu'un ou plusieurs signaux affectent positivement (en cinétique et en magnitude) l'expression de réponses de défense induite par un signal primaire. Par exemple, l'éthylène potentialise l'induction par l'AS de l'expression du gène PR-1 chez *Arabidopsis* (Lawton *et al.*, 1994). De nombreux travaux ont montré que l'AS lui-même joue un rôle dans la potentialisation de réponses de défense après élicitation (Kauss et Jeblick, 1995 ; Mur *et al.*, 1996). Chez le soja, de très faibles concentrations en AS stimulent l'expression de gènes de défense (PAL et glutathion-S-transférase), l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la mort cellulaire après infection par la bactérie avirulente *Ps. syringae* pv. *glycinea* (Shirasu *et al.*, 1997). Ces concentrations en AS sont cependant trop faibles pour induire seules ces réponses de défense. Chez le persil, l'AS à faible concentration aurait un rôle dans la potentialisation de certaines réponses de défense et dans l'induction directe d'autres gènes de défense comme certaines peroxydases (Thulke et Conrath, 1998). Toujours chez le persil, des effets du BTH seraient très similaires (Katz *et al.*, 1998).

#### 4.2.2. Relations entre l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène et l'acide abscissique

Il apparaît clairement aujourd'hui que les voies de signalisation peuvent être inter-reliées (Bostock, 1999 ; Dong, 1998 ; Glazebrook, 1999 ; Reymond et Farmer, 1998). Une analyse en microarray a cependant révélé que ces hormones ont peu de gènes cibles en commun, du moins au cours de la croissance chez *Arabidopsis* (Nemhauser *et al.*, 2006). Dans certains cas, les signaux agissent par antagonisme ou synergisme (Koorneef et Pieterse, 2008). Par exemple, l'AS bloque la biosynthèse de l'AJ chez la tomate (Doares *et al.*, 1995 ; Pena-Cortes *et al.*, 1993) ou contrôle négativement l'expression de gènes régulés par l'AJ (Doares *et al.*, 1995 ; Gupta *et al.*, 2000) et par l'éthylène (Gu *et al.*, 2000). Inversement, il peut y avoir également inhibition de l'action d'AS par l'AJ (Bostock, 1999 ; Sano et Ohashi, 1995). Dans d'autres cas, les signaux agissent en synergie pour activer des réponses de défense. Par exemple, dans des plantules de tabac, l'induction de l'expression des gènes PR-1 et PR-5 est plus importante lorsque du MeJA et de l'éthylène sont appliqués en combinaison (Xu *et al.*, 1994). Dans certains pathosystèmes, le contrôle négatif de la voie de l'AJ passe par celle de l'AS *via* la protéine NPR1 cytosolique ; une mutation du gène *NPR1va* active la voie de l'AJ qui contrôle ses propres gènes de synthèse. En revanche, lors d'une attaque d'herbivore, NPR1 va inhiber la voie de l'AS pour permettre l'activation de celle de l'AJ et stimuler les réactions de défenses spécifiques de ce traumatisme mécanique. NPR1 est

donc une protéine majeure dans la communication entre les voies de l'AS et de l'AJ, tout particulièrement pour son adaptation à la biologie du parasite (biotrophe *versus* nécrotrophe) (Speol *et al.*, 2007). Les mutants *coi1* d'*Arabidopsis* sont altérés dans l'induction de certains mécanismes liés à l'AJ mais surexpriment ceux dépendants de l'AS, avec une meilleure résistance aux souches virulentes de *Pseudomonas syringae* (Fey *et al.*, 1994).

Chez *Arabidopsis*, l'expression d'une défensine nécessite à la fois l'action de l'éthylène et de l'AJ, mais est indépendante d'AS (Dong, 1998 ; Penninckx *et al.*, 1996, 1998).

On distingue ainsi des sous-groupes de gènes qui sont induits au cours d'une interaction plante /agent pathogène mais ne sont pas régulés par les mêmes signaux. Ainsi, lors de l'interaction entre le tabac et le VMT, il y a au niveau de la feuille supérieure une induction indépendante d'AS de l'expression de certains gènes de défense SIS (SA-Independent, Systemically induced genes) au sein desquels l'induction de certains est régulée indépendamment de l'éthylène (Guo *et al.*, 2000). Lors de l'infection d'*A. thaliana* par *Erwinia carotovora*, l'expression de certains gènes est contrôlée par l'AJ et l'éthylène, alors que d'autres sont régulés par l'AJ (Norman-Setterblad *et al.*, 2000). Dans cette interaction, l'AS ne semble pas jouer un rôle majeur bien qu'il puisse induire de manière synergique les gènes contrôlés par l'AJ et l'éthylène et réprimer les gènes régulés par l'AJ seul.

Les relations entre l'AS et l'ET sont par contre plus obscures ; des analyses de microarrays suggèrent une action potentialisatrice de l'ET sur l'induction du gène *PR1* dépendant de l'AS, alors qu'une approche génétique démontre l'inverse. Ces techniques ont également révélé un effet synergique entre les voies de l'AJ et celle de l'ET dans l'induction d'un nombre de gènes de défense dans plusieurs pathosystèmes (Schenk *et al.*, 2000), avec une action inductrice très forte pour l'ET. Chez le cotonnier infecté par *Xanthomonas*, la transcription du gène *GhLOX1* codant une 9-lipoxygénase est fortement induite par l'action combinée de ces deux hormones (Champion *et al.*, résultats non publiés).

Récemment apparu sur la scène de la résistance, l'ABA interagit également avec les autres voies de signalisation. Cette molécule semble affecter la synthèse d'AJ lors de l'activation des défenses contre le champignon *Pythium irregulare* en intervenant en amont de ce dernier (Adie *et al.*, 2007). En effet, les voies de l'AJ et de l'ET sont stimulées dans des mutants déficients en ABA, alors qu'un traitement de plantes avec l'ABA exogène réduit la transcription de gènes dépendants de l'AJ et de l'ET (Flors *et al.*, 2008). Ces auteurs ont également montré que chez *Arabidopsis*, le champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* inhibe la synthèse d'ABA. Dans ce pathosystème, le gène de la callose synthase *pmr4*, sous contrôle de l'ABA, inhibe la voie de l'AS et permet ainsi à celle de l'AJ de contribuer la résistance à ce champignon. Un traitement par

l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique, inducteur de résistance, mime l'effet de l'ABA en augmentant la résistance. Dans le mutant d'*Arabidopsis* affecté dans l'expression de *pmr4*, l'AS dont l'inhibition de la voie est ainsi levée régule négativement la voie de l'AJ pour déclencher le processus de sensibilité à ce parasite. Cet exemple illustre la complexité des relations entre l'AJ, l'AS et l'ABA et traduit l'imbroglio de la communication entre ces voies de signalisation dans lesquelles le rôle des ROS n'est pas à sous-estimer (Kwak *et al.*, 2006).

A la lumière de la courte analyse que je viens de faire sur la résistance spécifique des plantes aux bioagresseurs, je retiendrai deux domaines qui vont conditionner la suite de mon introduction :

- celui des réactions oxydatives : la mort cellulaire programmée pourrait être sous la dépendance de phénomènes d'oxydation responsables de lésions directes de macromolécules biologiques,

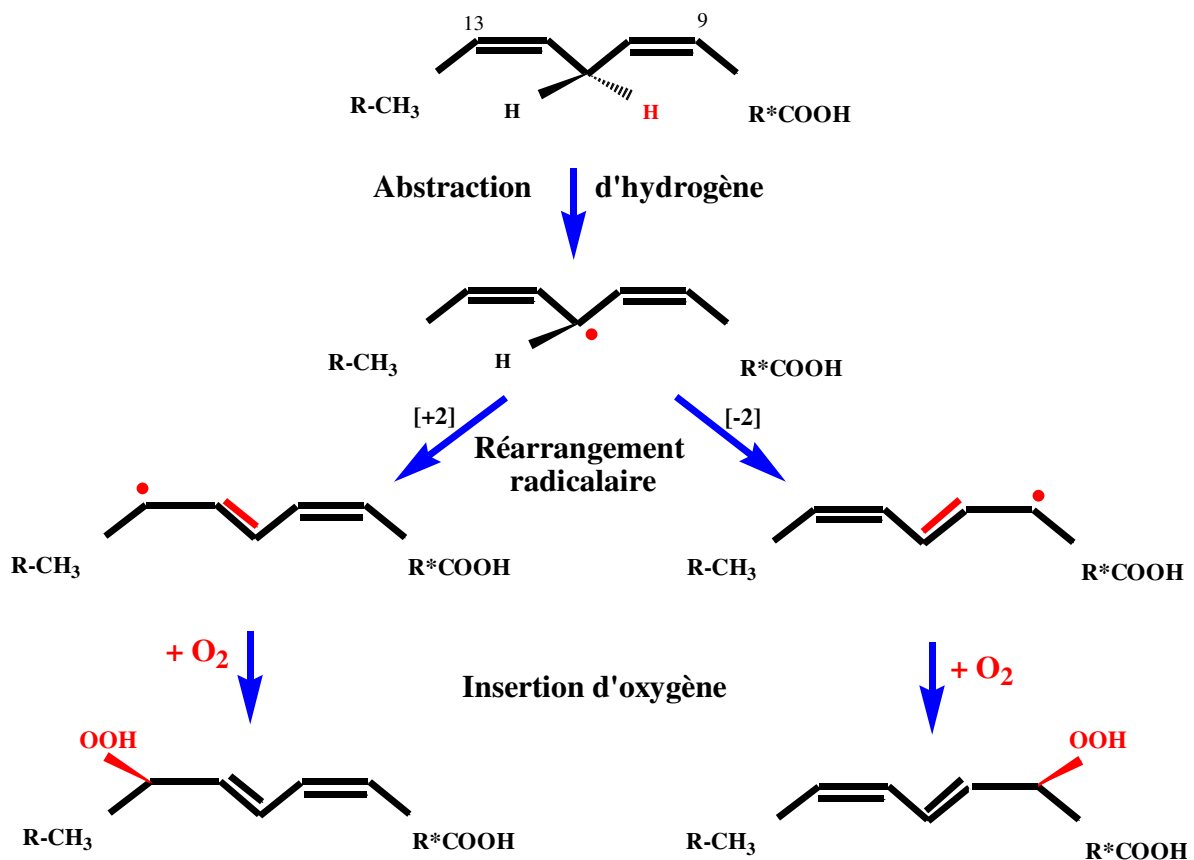
- et celui des oxylipines : ce sont les produits d'oxydation des lipides polyinsaturés, dont le rôle dans l'exécution de la mort cellulaire programmée est fortement soupçonné (Montillet *et al.*, 2005).

## **B. Les phénomènes de peroxydation des lipides dans la mort cellulaire.**

Les réactions peroxydatives sont responsables de lésions directes sur les molécules biologiques tels les acides nucléiques, les protéines et les lipides qu'ils sont susceptibles de dégrader notamment lors de la peroxydation des lipides, l'exemple le plus connu de ces réactions (Wardman, 1993 ; Rice-Evans *et al.*, 1991)

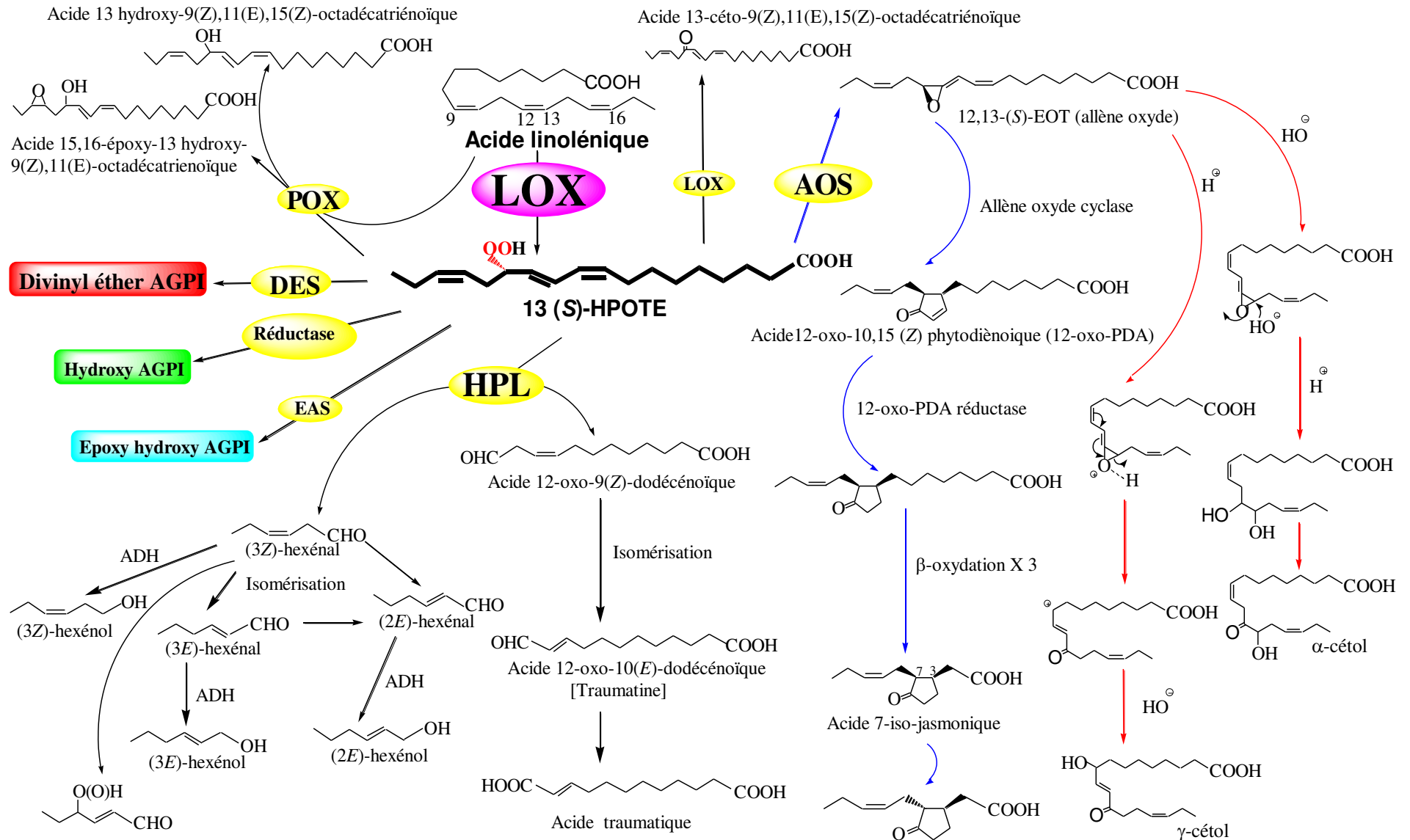
L'oxydation des lipides alimentaires est connue depuis longtemps : modification de l'odeur, du goût et des qualités nutritives des aliments. Les lipides des organismes vivants sont particulièrement sensibles à l'oxydation, notamment ceux formés d'acides gras polyinsaturés (comme l'acide linoléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique) dans les membranes cellulaires. La peroxydation des lipides est un mécanisme de dégradation qui correspond à l'introduction d'oxygène moléculaire dans des acides gras polyinsaturés (APGI). Ce phénomène est dû, soit à une réaction non enzymatique (auto-oxydation) initiée par les formes les plus réactives d'oxygène (Winston, 1990), soit à une réaction enzymatique catalysée par des lipoxygénases ou des cyclooxygénases (Brash, 1999). L'oxygénation s'opère sur le carbone central d'une structure de type 1,4 pentadiényle (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-). La peroxydation des lipides commence par le départ d'un atome d'hydrogène d'un AGPI, ce qui forme un radical lipidique qui se stabilise par réarrangement en un diène conjugué. L'addition d'une molécule d'oxygène forme un hydroperoxyde lipidique (Figure 14). (Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Winston, 1990). De

nombreux produits sont générés lors de la peroxydation des lipides : diènes conjugués, peroxydes, aldéhydes, alcanes, dont la plupart sont cytotoxiques (Figure 15). La formation de dérivés d'oxydation dans les bicouches lipidiques, plus hydrophiles, entraîne des perturbations de la micro-architecture membranaire et altère les fonctions des enzymes et transporteurs membranaires. De plus, l'autocatalyse de la peroxydation des lipides peut aboutir à la formation de concentrations élevées en dérivés d'oxydation qui altèrent la perméabilité membranaire.



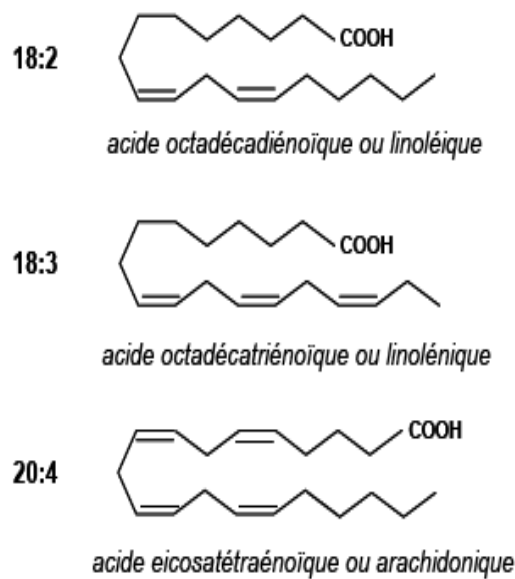
**Figure 14 : conversion de l'acide linoléique en 9-HPODE ou 13-HPODE par l'action des lipoxygénases.**

La formation d'un radical lipidique fait intervenir l'arrachement par la LOX d'un proton du C<sub>11</sub> du substrat C<sub>18</sub>:<sub>2</sub>. Le radical lipidique se stabilise par réarrangement en un diène conjugué. L'insertion d'une molécule d'oxygène par l'action de la LOX sur le C<sub>9</sub> ou C<sub>13</sub> forme un 9-HPODE ou 13-HPODE, respectivement (Hornung *et al.*, 1999).



**Figure 15 :** principaux métabolites secondaires issus de la décomposition enzymatique des 13-(S)-hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique (C18:3) via une activité lipoxygénase. Abréviations : ADH, alcool déshydrogénase ; AGPI, acides gras polyinsaturés ; AOS, allène oxyde synthase ; DES, divinyl éther synthase ; EAS, epoxy alcool synthase ; HPL, hydroperoxyde lyase ; LOX, lipoxygénase ; POX, peroxygénase.

Les molécules dérivées de ce mécanisme de peroxydation appartiennent à la famille des oxylipines définies comme des composés résultant d'une ou plusieurs étapes d'oxygénation d'un acide gras par une dioxygénase. Depuis peu, une définition plus large a été adoptée, considérant tous les AG oxygénés, qu'ils proviennent d'une réaction chimique ou enzymatique, comme des oxylipines (Farmer *et al.*, 2003). Chez les plantes, les oxylipines sont principalement générées à partir de l'acide linoléique (18:2) et l'acide linolénique (18:3) alors que chez les animaux leur précurseur est l'acide arachidonique (20:4) (Figure 16).



**Figure 16 : Principaux précurseurs des oxylipines chez les plantes et les animaux**

La peroxydation des lipides tient une place privilégiée dans la RH. Elle est à l'origine de nombreux métabolites impliqués dans la réponse de défense de la plante. Certaines données de la littérature laissent supposer que ce métabolisme oxydatif pourrait également intervenir dans la phase d'exécution de la mort cellulaire hypersensible. Chez le tabac élicité, la mise en place du processus de peroxydation est par exemple corrélée au développement des symptômes hypersensibles (Rustérucchi *et al.*, 1999). L'infiltration d'hydroperoxydes d'acide gras et de certains de leurs dérivés au niveau de feuilles induit par ailleurs une mort cellulaire dont l'aspect rappelle celui de la mort hypersensible (Rustérucchi *et al.*, 1999). Une approche similaire conduite sur feuilles de cotonniers pré-traitées à l'AJ a généré un phénotype HR-like (Jalloul, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007).

De nombreux chercheurs se sont attachés à comprendre par quels mécanismes chez les plantes s'exécutait la RH, la désorganisation des membranes plasmiques semble être un des événements les plus précoces (Freytag *et al.*, 1994 ; Bestwick *et al.*, 1995 ; Bennett *et al.*, 1996).

Cette désorganisation des membranes a été associée avec la production massive d'hydroperoxydes d'acides gras polyinsaturés et la production de ROS (Rustérucchi *et al.*, 1996 ; Bestwick *et al.*, 1997 ; van Ginkel et Sevanian, 1997). En effet, lorsque le burst oxydatif est bloqué par des inhibiteurs, une suppression de la peroxydation des lipides est observée (Jabs *et al.*, 1996). Les ROS pourraient donc initier cette peroxydation, celle-ci s'entretenant par auto-oxydation, et ou induire des systèmes enzymatiques spécifiques comme les LOXs.

### **1. Auto-oxydation des lipides**

La peroxydation non enzymatique des lipides, également connue sous le nom d'autoxydation, touche essentiellement les acides gras insaturés membranaires. Cette autoxydation peut être initiée par toute molécule suffisamment réactive pour réaliser l'abstraction d'un hydrogène au niveau d'un groupe méthylène ; il s'agit autrement dit des radicaux centrés sur l'oxygène réactif, radicaux peroxydes (Montillet *et al.*, 2004). La réactivité des ROS est très variable selon la nature du radical. Parmi les radicaux formés chez les êtres vivants,  $O_2^{\bullet-}$ , tout comme  $NO^{\bullet}$ , ne sont pas très réactifs mais constituent des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives, dont la première est  $H_2O_2$ . C'est une forme non radicalaire de ROS, stable, qui possède un fort pouvoir oxydant mais qui, de façon spontanée, ne réagit que très faiblement avec les molécules organiques. Cette forme active d'oxygène peut diffuser librement à travers les membranes biologiques à l'inverse de  $O_2^{\bullet-}$ .  $H_2O_2$  est toxique pour les cellules car elle inactive certaines enzymes du cycle de Calvin, cycle qui intervient dans la fixation du carbone de l'air (Foyer, 1993).

En présence de métaux de transition ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ),  $H_2O_2$  se décompose en anion hydroxyl ( $OH^-$ ) et en radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) selon la réaction de Fenton. Ainsi, la présence simultanée d' $O_2^{\bullet-}$ , de  $H_2O_2$  et de métaux de transition permet la décomposition de  $H_2O_2$  en  $OH^{\bullet}$  et en  $O_2$  selon la réaction d'Haber-Weiss. Le radical hydroxyle est extrêmement réactif, mais il ne peut pas diffuser de son site de production (Del Rio *et al.*, 1992 ; Asada, 1994 ; Allen, 1995 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Ce radical possède un électron non apparié, il capte facilement un électron pour revenir à un état stable, mais il produit de nouveaux radicaux libres de type peroxydasique, extrêmement réactifs, susceptibles d'entraîner, par des réactions en chaîne, de nouvelles espèces radicalaires, instables. L'exemple le plus connu de ces réactions est la peroxydation des lipides.

Une fois initié, ce processus de peroxydation peut se propager en présence d'oxygène au sein des membranes. Cette réaction radicalaire en chaîne est facilitée par la proximité des AGPI dans les bicouches lipidiques. L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), généré par photo-oxydation, peut également participer à la formation d'HPX membranaires par une réaction d'addition aux doubles liaisons des AG. Dans ce cas, la peroxydation ne pourra cependant pas se propager, car aucun

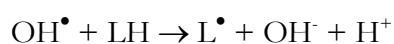


intermédiaire réactionnel radicalaire n'est formé (Montillet *et al.*, 2004). Contrairement aux HPX d'origine enzymatique dont les énantiomères sont généralement chiraux, les isomères provenant d'une autoxydation existent sous forme d'un mélange racémique (concentration équivalente des énantiomères R et S). Les HPX d'origine non enzymatique sont continuellement produits chez les plantes saines et seraient soumis à un « turnover » important. Des travaux font également état d'une peroxydation dépendante des ROS dans le cadre de la RH (Göbel *et al.*, 2003 ; Montillet *et al.*, 2005). L'autoxydation s'accompagnant en général de la synthèse d'oxylipines par décomposition des HPX. Il est possible que ce phénomène d'oxydation contribue à l'exécution de la MCP chez les plantes par le biais de la déstabilisation ou de la dégradation des membranes cellulaires. D'autre part, on ne peut exclure que les oxylipines issues des HPX membranaires puissent oxyder, une fois libérées, les constituants cellulaires. Enfin, des composés tels que le malondialdéhyde (MDA) et les phytoprostanes pourraient encore jouer le rôle de signaux et participer ainsi à la mise en place de mécanismes de défense lors de la RH (Eckart *et al.*, 2008).

Dans les systèmes biologiques, la réaction d'auto oxydation comporte 3 étapes incluant l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure 17).

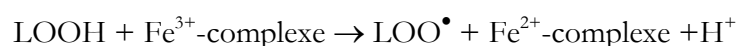
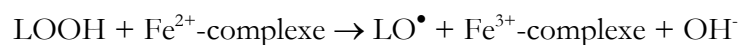
### 1.1 L'initiation

Cette étape de la peroxydation des lipides est dépendante des radicaux libres centrés sur l'oxygène. Sous son état activé, l'oxygène peut soustraire l'atome d'hydrogène présent sur le carbone central d'une structure 1, 4-pentadiényle qui forme le motif bis-allylique élémentaire des AGPI. Seul le radical hydroxyle (OH•) ou des complexes « perferryl » sont capables d'initier la peroxydation des lipides par l'abstraction l'un atome d'hydrogène du groupe méthylène –CH<sub>2</sub>–. Le carbone radical se stabilise par réarrangement en un diène conjugué.



### 1.2 La propagation

Le radical lipidique (L•) qui résulte de l'abstraction de l'hydrogène allylique réagit rapidement avec une molécule d'oxygène pour donner naissance au radical peroxyde (LOO•). Ce dernier peut réagir avec un AGPI adjacent, créant ainsi un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un nouveau radical alkyle (L'•) capable à son tour de réagir avec une nouvelle molécule d'oxygène. Ce caractère auto-catalytique de la réaction en chaîne est renforcé par le fait que les hydroperoxydes lipidiques produits en présence de traces de fer forment des radicaux libres du type alkoxyde (LO•) et peroxyde (LOO•) selon les réactions suivantes :





Ces nouveaux radicaux permettent alors de propager et d'amplifier le processus de peroxydation des lipides (Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Winston, 1990).

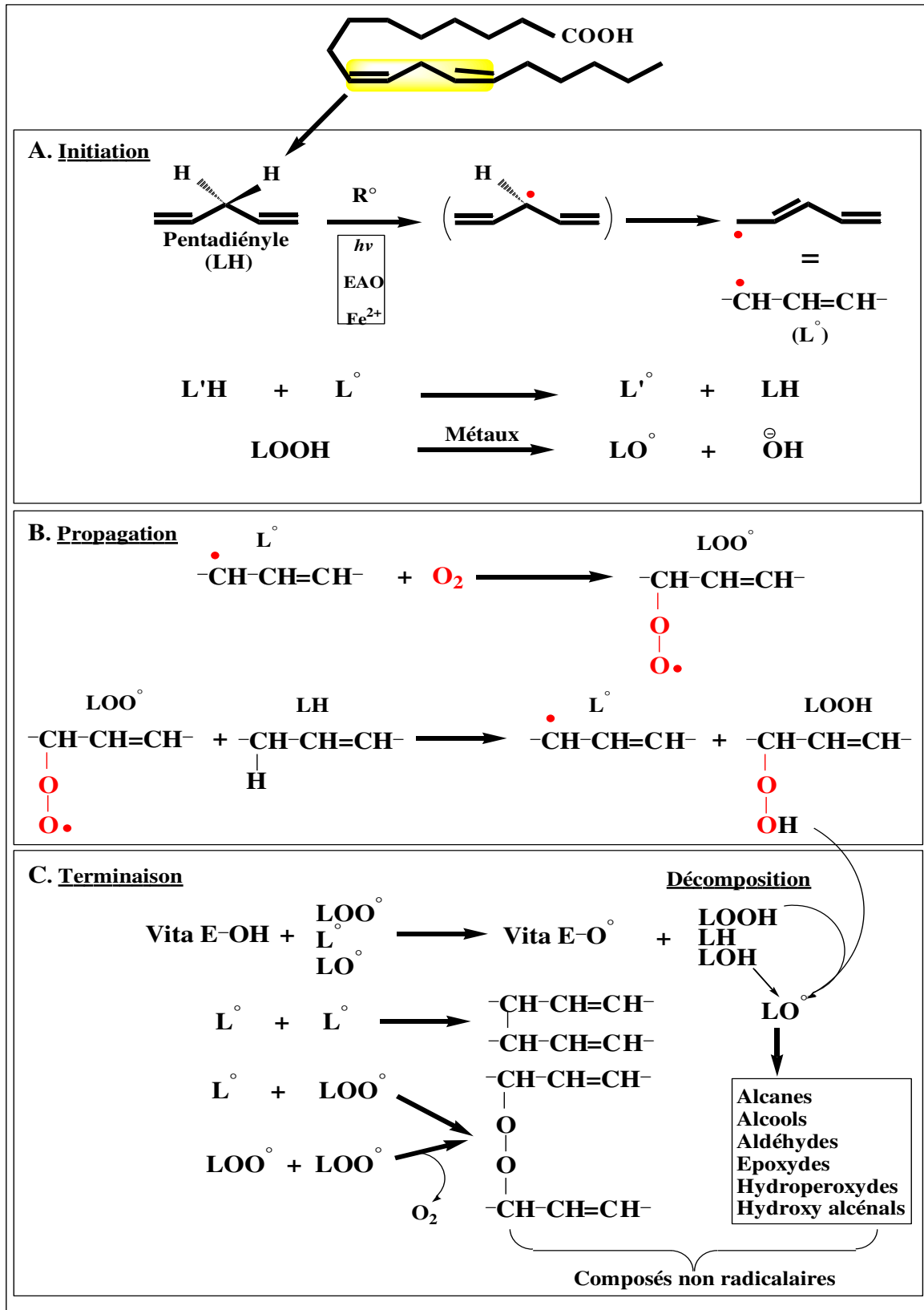


Figure 17 : La peroxydation des lipides (A, B et C) : un mécanisme de réactions en chaîne (d'après Winston, 1990).

### 1.3 La terminaison

Ce processus radicalaire peut être arrêté grâce au piégeage des radicaux formés lors de l'étape de propagation par :

- un autre radical lipidique : le produit non radicalaire issu de cette rencontre n'est plus capable d'initier et de propager le processus de peroxydation des lipides.
- une molécule qui piège les radicaux libres : ce sont des molécules liposolubles capables de transformer des radicaux peroxydes et alkoxydes en peroxyde et alcool correspondant par le transfert d'un atome d'hydrogène. Ce dernier permet l'arrêt de la propagation des radicaux lipidiques au sein de la membrane. Dans les cellules végétales et animales, le piège à radical le plus fréquemment mis en évidence est la vitamine E ( $\alpha$ -tocopherol). D'autres composés liposolubles comme le  $\beta$ -carotène, les ubiquinolés ou les polyphénols sont capables de piéger des radicaux libres lipidiques (Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Winston, 1990).

## 2. L'oxydation enzymatique des acides gras polyinsaturés

Trois enzymes distinctes catalysent la formation d'hydroperoxydes (HPX) à partir des AG : les mono-oxygénases à cytochrome P450, les lipoxygénases (linoléate :oxygen oxydoréductase, EC 1.13.11.12 ; LOX) et les  $\alpha$ -dioxygénases ( $\alpha$ -DOX). Parmi celles-ci, seules les mono-oxygénases n'interviendraient pas lors de la RH et seraient plutôt impliquées dans le métabolisme cellulaire basal, notamment dans la synthèse de cutine (Blée, 2002).

### 2.1 Rôle du métabolisme des oxylipines dans la mort cellulaire hypersensible

#### 2.1.1 Métabolisme d'alpha-dioxygénation

Les  $\alpha$ -DOX sont des protéines hémiques catalysant, comme leur nom l'indique, la peroxydation des AG saturés et insaturés en position  $\alpha$ . Elles sont actives sur des AG libres, mais certaines d'entre elles sont également capables de peroxyder des AG membranaires. Chez les plantes supérieures, les  $\alpha$ -HPX sont rapidement réduits en alcools par une réductase qui n'a pas encore été caractérisée. Il a été suggéré que les  $\alpha$ -DOX pourraient assurer ce rôle (Blée, 2002). La première  $\alpha$ -DOX a été identifiée chez le tabac élicité par la harpine. Cette enzyme a tout d'abord été nommée PIOX pour « pathogen-induced oxygenase » avant d'être rebaptisée  $\alpha$ -DOX1. L'expression du gène  $\alpha$ -DOX1 est significativement stimulée au cours des interactions compatibles et incompatibles, mais l'accumulation des transcrits est plus précoce et plus importante lors de la RH que lors de la maladie. Le génome d'*A. thaliana* contient deux gènes codant des  $\alpha$ -DOX, notés  $\alpha$ -DOX1 et 2. Cependant, seule l' $\alpha$ -DOX1 serait impliquée dans la RH. Même si les produits de la l' $\alpha$ -DOX1 n'ont pas été mis en évidence chez *A. thaliana*, la

preuve indirecte de l'existence d'un métabolisme d' $\alpha$ -dioxygénation opérant spécifiquement dans le cadre de la RH a été apportée via l'étude de plantes transgéniques affectées dans l'expression du gène codant la dioxygénase. Chez le tabac développant une RH, les produits majoritaires de l' $\alpha$ -DOX1 sont le 2-HOTE et son produit de dégradation, l'acide heptadécatriénoïque (ou 17:3). Le 2-HOTE ne possède pas d'activité anti-microbienne. Néanmoins, son infiltration conjointe avec la souche avirulente de la bactérie *P. syringae* pv. *syringae* conduit à une diminution importante de la nécrose hypersensible (Hamberg *et al.*, 2003). En outre, la réduction de l'activité  $\alpha$ -DOX chez l'arabette provoque une RH précoce associée à une plage nécrotique plus étendue alors que l'augmentation de cette activité enzymatique diminue l'intensité des symptômes hypersensibles et retarde leur apparition (Ponce de Léon *et al.*, 2002). Ces auteurs ont donc proposé un rôle pour le 2-HOTE dans le contrôle de la propagation de la MCP hypersensible.

### 2.1.2 Peroxydation dépendante des lipoxygénases

*Activité lipoxygénase* – Les LOX sont présentes chez les plantes, les animaux et les champignons (Maccarrone *et al.*, 2001 ; Oliw, 2002). Elles constituent une famille d'oxygénases contenant un fer non hémunique qui catalysent la dioxygénation regio- et stéréo-sélective des AGPI. Le mécanisme de la réaction enzymatique des LOXs est similaire pour les diverses formes de LOX (Brash, 1999 ; Rosahl, 1996). Elles catalysent la formation d'hydroperoxydes par dioxygénation de la structure (1Z, 4Z)-pentadiénique des AGPI. Les LOX végétales contiennent un atome de fer non-hémunique, qui initie la réaction de peroxydation en réalisant l'abstraction d'un hydrogène au niveau du groupe méthylène du pentadiène (Figure 14). Le fer non hémunique joue le rôle de catalyseur dans cette réaction. Il est inactif sous sa forme  $Fe^{2+}$  (réduit) et actif sous la forme  $Fe^{3+}$ . La réaction commence par la fixation de l'AGPI au site actif de l'enzyme qui contient le fer sous sa forme  $Fe^{3+}$ . Le proton présent sur le carbone central de la structure 1Z, 4Z pentadiényle (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) des AGPI est arraché. Cette réaction produit un radical pentadiényle avec un électron non apparié délocalisé et du  $Fe^{2+}$ . Deux réarrangements sont possibles aboutissant à l'introduction d'oxygène moléculaire soit en [+2], soit en [-2] du site d'abstraction de l'hydrogène. L'oxygène moléculaire réagit alors sur le radical pentadiényle pour produire un radical peroxyde qui est réduit par l'électron du  $Fe^{2+}$ . Il se forme donc un hydroperoxyde et un  $Fe^{3+}$  qui permet la restauration de l'activité de l'enzyme (Rosahl, 1996 ; Brash, 1999).

La nature du réarrangement conditionne la régio-spécificité des LOX (Hornung *et al.*, 1999). Chez les plantes, les activités LOX sont classées en deux catégories (9 ou 13) suivant l'atome de carbone qu'elles peroxydent sur le substrat de référence qu'est l'acide linoléique en C18:2. Ces enzymes sont le plus souvent énanti-sélectives, si bien que les isomères majoritairement observés chez les plantes sont des 9(S)- et 13(S)-HPX (Figure 14), provenant de

la dioxygénation du 18:2 et 18:3. L'oxydation se fait donc par l'introduction d'O<sub>2</sub> sur le carbone en position 9 (9-LOX) ou 13 (13-LOX) produisant alors respectivement des 9 ou 13 hydroperoxydes des AGPI en C18:2 et C18:3. Le rapport entre les 9 et les 13 hydroperoxydes, ainsi que les contraintes stéréosélectives, diffèrent selon la nature des lipoxygénases. Chez le soja, la LOX-1 produit surtout des 13-hydroperoxydes avec une configuration absolue de type *S* (90 % contre 10 % pour les 9-hydroperoxydes), alors que la LOX-2 produit autant d'hydroperoxydes en position 13 qu'en position 9 sans stéréosélectivité (Kato *et al.*, 1992). Ainsi, des travaux ont montré que les conditions de pH et la concentration en oxygène jouent un rôle crucial dans la spécificité des LOXs (Grechkin, 1998). La LOX-1 de soja, à pH 6 produit 25% de 9-(*S*)-hydroperoxydes contre 75% de 13-(*S*)-hydroperoxydes ; alors que plus de 90% de 13-(*S*)-hydroperoxydes sont formés à pH 9. Aussi, dans des conditions de faible concentration en oxygène, cette LOX perd la régiospécificité et produit un mélange racémique de 9 et 13 hydroperoxydes (Grechkin, 1998). Hornung et ces collaborateurs (1999) montrent élégamment que certaines chaînes latérales d'acides aminés de LOX jouent un rôle crucial en imposant la régiospécificité d'oxydation de l'AGPI. Par mutagenèse dirigée, ces auteurs ont montré que la transformation de 13-LOX de concombre en 9-LOX par remplacement de l'histidine 608 par la valine a modifié la charge et donc l'orientation de l'AGPI dans le site actif de l'enzyme (Figure 18).

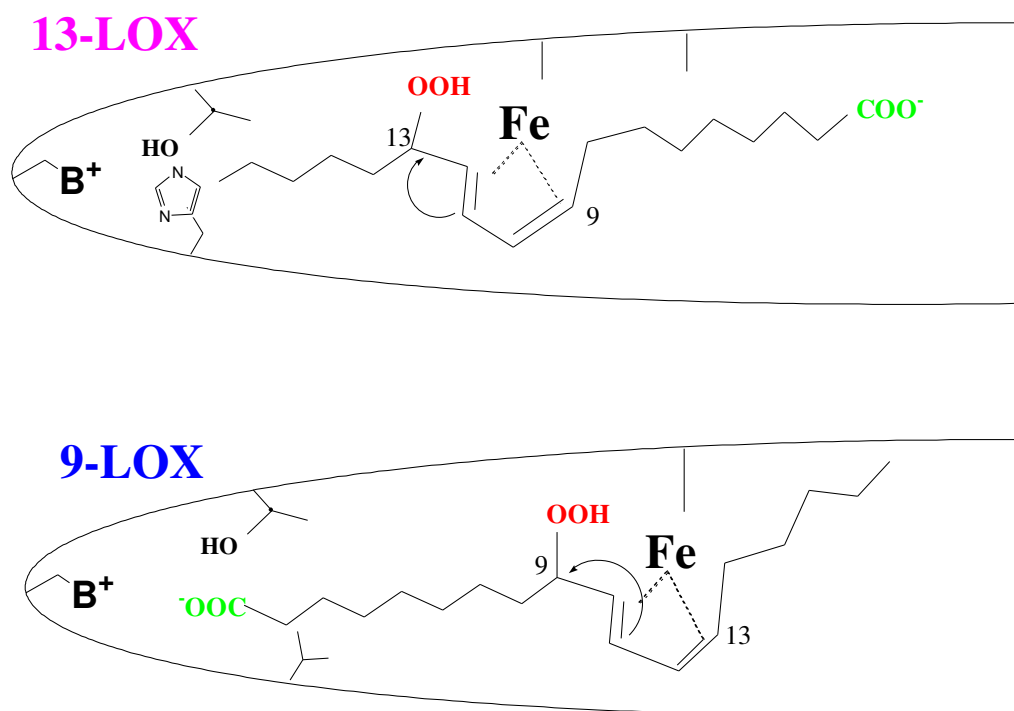


Figure 18 : Schéma représentant l'orientation de l'AGPI dans le site actif de la 13- et 9-LOX (Hornung *et al.*, 1999).

Notons au passage que l'action d'une 9- ou 13-LOX sur le substrat en C16:3 conduira à la formation de 7(S)- ou 11(S)-HPX, respectivement (Montillet *et al.*, 2004). De manière générale, les LOX agiraient préférentiellement sur des AGPI libres (Feussner et Wasternack, 2002). Néanmoins certaines d'entre elles comme la LOX de concombre associée au corps lipidiques ou encore la LOX1 de soja sont capables de peroxyder des AGPI estérifiés (Feussner *et al.*, 1997, 1998 ; Feussner *et al.*, 2001). Enfin, les LOX peuvent également métaboliser leurs propres produits, les HPX, pour former des acides cétydiéniques et cétytriéniques. Une voie enzymatique indépendante des LOX a cependant été mise en évidence pour la synthèse de cétydiènes, si bien que la nature exacte des mécanismes responsables de la production de ce type de composés *in planta* est incertaine.

Chez les animaux, les hydroperoxydes provenant de l'action des LOXs sur l'acide arachidonique (C20:4) (Figure 16) sont convertis en eicosanoïdes (leucotriènes et lipoxines) par un mécanisme appelé « cascade de l'acide arachidonique ». Ces derniers jouent un rôle bio-régulateur dans les processus physiologiques comme les réactions immunitaires et de défense (Brash, 1999). En comparaison, chez les végétaux, le rôle des lipoxygénases est supposé dans des processus physiologiques comme la sénescence, la germination et les réponses à des stress biotique ou abiotique (blessure et agression par des microorganismes pathogènes) (Feussner *et al.*, 2001 ; Grechkin, 1998 ; Rustérucchi *et al.*, 1999).

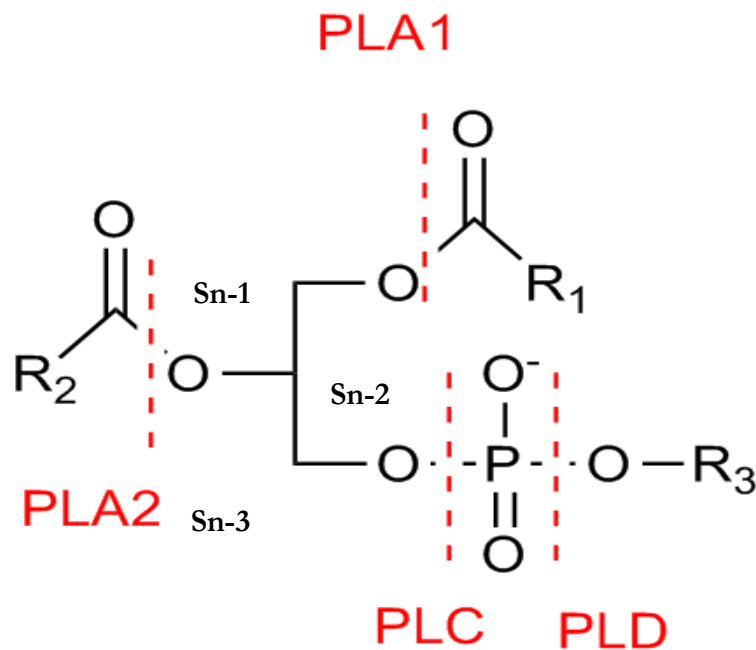
*Distribution et localisation des lipoxygénases* – Elles ont été identifiées chez de nombreuses plantes telles que l'arabette, le tabac, le concombre, la pomme de terre, l'orge, la tomate, *etc.* Elles forment des familles multigéniques dont les différentes isoformes sont généralement spécifiques de certains tissus et peuvent être induites en réponse aux stress (blessure, agents pathogènes, stress oxydant, salin et hydrique) (Alami *et al.*, 1999 ; Bostock *et al.*, 1992 ; Maccarrone *et al.*, 2000). Elles sont localisées dans divers compartiments subcellulaires. Toutefois, la plupart d'entre elles sont solubles et situées dans le cytoplasme ou le chloroplaste (Feussner et Wasternack, 2002). D'après ces auteurs, les 9-LOX serait exclusivement cytosoliques alors que les 13-LOX pourraient être retrouvées à la fois dans le stroma et le cytoplasme (Gao *et al.*, 2008a). L'ensemble de ces données laisse donc présager des rôles physiologiques distincts suivant les isoformes. L'implication des LOX a été suggéré dans des processus tels que la sénescence (Rosahl, 1996), la germination (Feussner *et al.*, 2001), la nodulation ou encore le développement du tubercule de pomme de terre (Kolomiets *et al.*, 2001).

*Peroxydation des lipides et mort cellulaire hypersensible* – L'induction de l'expression de gènes codant des 9-LOX a été mise en évidence sur différents pathosystèmes. Ainsi, l'expression des gènes *POTLX-3* et *AtLox1* était significativement stimulée durant les interactions compatibles et

incompatibles chez la pomme de terre et l'arabette, respectivement. Cette augmentation des niveaux de transcrits étaient plus précoces au cours de l'interaction incompatible que lors du développement de la maladie (Kolomiets *et al.*, 2000). Chez la pomme de terre, l'accumulation des produits de POTLX-3 a de plus été mise en évidence lors de la RH. Des travaux conduits sur feuilles de tabac élicitées par la cryptogéine ont montré la mise en place d'un processus massif de peroxydation des lipides impliquant une 9(S)-LOX corrélée à l'apparition des symptômes nécrotiques (Rustérucchi *et al.*, 1999), à l'image de ce qui se passe chez le cotonnier résistant infecté par *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* (Jalloul *et al.*, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que la peroxydation dépendante des 9-LOX pourrait jouer un rôle dans la RH. Les 9-HPX étant les précurseurs de nombreuses oxylipines dotées de propriétés antimicrobiennes, il est vraisemblable que ce métabolisme participe à la défense de la plante. Néanmoins, les travaux de Rancé *et al.* (1998) ont clairement établi, chez le tabac, que des lignées anti-sens présentant une altération sévère de l'expression du gène codant la 9-LOX étaient devenues sensibles à la race avirulente du champignon *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. D'autre part, il a été démontré que l'infiltration d'HPX dans des feuilles de tabac, ainsi qu'un traitement de protoplastes de tomate par ces mêmes HPX, était capable d'induire une MCP (Rustérucchi *et al.*, 1999). Il semblerait donc que les 9-HPX et certains de leurs dérivés puissent participer à l'exécution de la mort hypersensible chez les plantes. Compte tenu de la réactivité des HPX, on peut aisément imaginer que ces derniers contribuent à l'oxydation des macromolécules cellulaires (ADN, protéines et lipides) lors de la mort cellulaire programmée hypersensible. En outre, il a été rapportée que les 9-cétodiènes, qui sont synthétisés durant la RH chez l'arabette, sont des composés cytotoxiques (Vollenweider *et al.*, 2000). Ces oxylipines pourraient donc, elles aussi, contribuer à la mort cellulaire, et cela selon un mécanisme qui pourrait être lié à leur nature électrophile. La peroxydation lipidique dépendant des 13-LOX a été, quant à elle, régulièrement associée aux réponses de défense accompagnant la mort cellulaire hypersensible, notamment au travers de la synthèse de jasmonate et d'oxylipines dotées de propriétés antimicrobienne. Jusqu'ici, à notre connaissance, aucune donnée de la littérature ne rattache les 13-HPX et/ou leurs dérivés à l'exécution de la MCP induite par les agents pathogènes. Même si les travaux de Göbel *et al.* (2003) montrent que, chez la pomme de terre, des 13-LOX peuvent compenser l'absence de POTLX-3 lors de la RH, cela suggère tout au plus que le processus de peroxydation est important pour le développement des symptômes, mais ne démontre pas le rôle d'une voie spécifique de la position 13 dans la phase ultime de la mort hypersensible.

### 2.1.3 Le rôle des lipasees

Les lipases sont des enzymes ubiquistes que l'on retrouve aussi bien chez les organismes inférieurs tels que les bactéries, champignons ou levures que chez les organismes supérieurs tels que les plantes et les animaux. Elles forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides à longues chaînes d'acides gras en glycérol et en acides gras correspondants. Se sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique (Fickers *et al.*, 2008). Chez les plantes supérieures, les lipases interviennent dans la transduction du signal qui régule les mécanismes de défense contre des agents pathogènes. En effet, les oxylipines octadécanoïques telles que l'acide jasmonique sont synthétisées à partir d'acides gras, notamment l'acide linoléique, en présence de lipases membranaires (Farmer et Ryan, 1992 ; Stelmach *et al.*, 2001 ; La Camera *et al.*, 2004).



**Figure 19 : Différents sites de clivage des phospholipases**

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes présents dans divers tissus de la plante : les triacylglycérol hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines, les phospholipases C et D et les constituants du dernier groupe, dénommés acyl-hydrolases. Les lipid acyl-hydrolases (LAH) présentent peu de spécificité pour leur substrat ; elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides, mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification (Hills et Mukherjee, 1990). Les principales acyl-hydrolases sont les phospholipases A et B (PL A-B) (Figure 19), les glycolipases, les sulfolipases et les monoglycéride



lipases (Fickers *et al.*, 2008). L'une de ces LAH est une protéine de type patatine « patatine-like » : la PLA<sub>2</sub> calcium-indépendante, (Holk *et al.* 2002 ; Ryu, 2004). Chez la pomme de terre, les patatines sont codées par une famille multigénique comptant 10 à 18 membres par génome haploïde, avec un fort pourcentage d'homologie entre-elles (Mignery *et al.*1988). Les PLA<sub>2</sub> sont un groupe de protéines dont activité acyl-hydrolase n'est pas spécifique, libérant des groupes acyle de plusieurs types de lipides comprenant des phospholipides, des lysophospholipides, des galactolipides et des mono et diacylglycerols (Anderson *et al.*, 2002). Elles sont de plus dotées d'une activité acyl-transférase et possèdent des propriétés inattendues telles que des propriétés anti-microbiennes (Sharma *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont suggéré l'implication des LAH dans la RH. A ce titre, trois gènes orthologues de patatine (*NtPat1-3*) sont rapidement induits dans des feuilles de tabac infectées par le VMT. Cet événement est suivi par l'augmentation de l'activité PLA<sub>2</sub> concomitante à l'apparition de la RH (Dhondt *et al.*, 2002). Cette induction a été suggérée pour initier la synthèse des signaux de défense dérivés d'acides gras en libérant des substrats à partir des lipides membranaires. Chez *Arabidopsis*, l'activité d'une patatine liée à la phosphatidylcholine libère les acides gras des positions sn-1 et sn-2 (Holk *et al.*, 2002). Chez cette plante, il existe au moins 10 gènes de patatine (PLA I-IV), dont l'un PLA IIA, est induit en réponse à divers stress biotique et abiotique (ABA, AS, le JA et ROS) (Narusaka *et al.*, 2003). Il a été démontré que le fonctionnement des gènes de 9-lipoxygénase et de galactolipase est suffisant pour provoquer la mort cellulaire programmée pendant la RH chez le tabac. Les LAH fournissent les 9-LOXs en substrats issus de l'hydrolyse des galactolipides des enveloppes des chloroplastes. Chez le tabac, l'évolution concomitante des activités 9 LOX et galactolipase avec la peroxydation de lipides ont été révélée suite à un traitement à la cryptogéine et une inoculation par une souche avirulente de *Ralstonia solanacearum* (Cacas *et al.*, 2005). Les résultats obtenus ont clairement précisé qu'une coexpression des gènes LOX et LAH dans la peroxydation des lipides était un important caractère de la RH du tabac. La confirmation du rôle de la PLP2 (patatine-like protein 2) dans l'exécution de la mort cellulaire chez *Arabidopsis* infecté par *Botrytis cinerea* a été récemment apporté (La Camera *et al.*, 2009). Enfin, chez le cotonnier, une étude biochimique et moléculaire a montré que l'expression du gène *GbPat1* était stimulée pendant la réaction incompatible entre le cultivar Réba B50 et la race 18 de *Xcm* (Cacas *et al.*, 2008).

Ces quelques données suggèrent que les LAH serait associées à l'oxydation des lipides en mobilisant les AGPI des membranes chloroplastiques, amorçant le processus de peroxydation 9-LOX-dépendant qui accompagne la RH chez le cotonnier.

### 2.1.4 Métabolisation enzymatique des hydroperoxydes d'acides gras

Ces hydroperoxydes dérivés des acides linoléique et linoléique sont des molécules aliphatiques très réactives qui sont métabolisées rapidement en de nombreux produits de décomposition physiologiquement actifs (Rosahl, 1996 ; Blée et Joyard, 1996) regroupés sous le générique d'oxylipines. Cette décomposition peut se réaliser sous l'effet de divers éléments physico-chimiques (traces de métaux, chaleur, UV) ou par divers systèmes enzymatiques (peroxygénase, hydroperoxyde lyase, allène oxyde synthase, divinyl ether synthase, LOX) (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Blée et Joyard, 1996 ; Feussner *et al.*, 2001 ; Grechkin, 1998 ; Howe et Schmitter, 2002). Certains de ces produits ont été particulièrement étudiés en raison de leur rôle potentiel dans la transduction de certains signaux (acide jasmonique et 4-hydroxy alcénals) ou de la facilité avec laquelle ils peuvent être analysés (alcanes, aldéhydes) (Figure 15). Dans ce dernier cas, leur présence est retenue comme marqueur de la peroxydation des lipides.

*Voie de l'hydroperoxyde lyase* : voie dans laquelle les hydroperoxydes sont transformés en aldéhyde de courte chaîne (C<sub>6</sub> et C<sub>9</sub>) et en ω-oxo- (C<sub>12</sub> et C<sub>9</sub>) des AGPI (Feussner *et al.*, 2001).

*Voie de l'allène oxyde synthase* : voie par laquelle l'allène oxyde synthase transforme le 13-(S)-HPOTE en AJ, α- et γ-cétols, les 9-(S)-HPOTE, 13-(S)-HPODE et 9-(S)-HPODE en α- et γ-cétols, mais pas en cyclopentanones (Feussner *et al.*, 2001 ; Grechkin, 1998). L'acide jasmonique est la molécule finale de cette voie encore connue comme la voie des octadécanoïdes.

*Voie de la peroxygénase* : voie dans laquelle le transfert d'oxygène intramoléculaire convertit les hydroperoxydes des AGPI en époxy- ou dihydrodiol (Feussner *et al.*, 2001).

*Voie de la divinyl ether synthase* : Dans cette voie, les hydroperoxydes des AGPI sont transformés en divinyl ether qui sont très cytotoxiques (Feussner *et al.*, 2001).

### 2.1.5 La voie des octadécanoïdes ou voie des 13-LOX

Les jasmonates sont à ce jour les oxylipines qui ont été le plus étudiées (Kazan et Manners, 2008). Leur voie de biosynthèse est représentée (en rouge figure 20). Le précurseur du jasmonate (JA) ou acide (3R,7S)-jasmonique est l'acide linoléique (C 18:3) (Sembdner et Parthier, 1993). Cet acide gras est tout d'abord peroxydé par une 13-LOX plastidiale. Le 13-HPOTE issu de cette réaction subit ensuite une étape de déshydratation par une AOS du groupe CYP74A pour former l'allène oxyde correspondant ou acide 12,13-époxyoctadéca-(9Z,11E,15Z)-triénoïque (12,13-EOT). Cet époxyde étant instable, lorsqu'il n'est pas métabolisé par l'allène oxyde cyclase (AOC) en 12-OPDA (acide 12-oxo-(10Z,15Z)-phytodiénoïque), il se décompose en α-cétol et γ-cétol. La cyclisation du 12,13-EOT est la dernière réaction se déroulant dans le chloroplaste. Le 12-OPDA est ensuite transporté dans le peroxydosome avant d'y être réduit en OPC-8:0 (acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoïque) par l'OPDA réductase (Turner *et al.*, 2002). La voie de biosynthèse du JA s'achève par trois étapes de β-oxydation. Enfin, le JA peut encore être méthylé

par une carboxyle méthyle-transférase ou JMT (Séo *et al.*, 2001 ; Schaller *et al.*, 2005). Le JA et sa forme méthylée (MJ) sont connus pour être produits en réponse à la blessure et à des stress mécaniques. Ils orchestrent la défense des plantes face aux insectes herbivores notamment via l'induction de la synthèse d'inhibiteurs de protéases à sérine (Farmer et Ryan, 1990 ; Royo *et al.*, 1999). Ces oxylipines jouent également un rôle dans la défense contre les micro-organismes pathogènes nécrotrophes et certains agents biotrophes (Turner *et al.*, 2002). Ils induisent la synthèse de peptides et protéines antifongiques tels que les défensines et les thionines (Reymond et Farmer, 1998). L'application de JA sur différents végétaux active par ailleurs la production de métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes comme les phytoalexines. L'OPDA, qui a longtemps été considéré comme un simple précurseur du JA, participerait lui aussi aux réponses de défense (Stintzi *et al.*, 2001 ; Turner *et al.*, 2002 ; Farmer *et al.*, 2003). Il est également probable que cette hormone puisse réguler la propagation des symptômes nécrotiques lors de la RH (Kazan et Manners, 2008). Il a été proposé que l'effet du JA sur les lésions serait lié à une production moins importante d'EAO. Cependant, le mécanisme exact d'action du JA est loin d'être compris (Hoeberichts et Woltering, 2002).

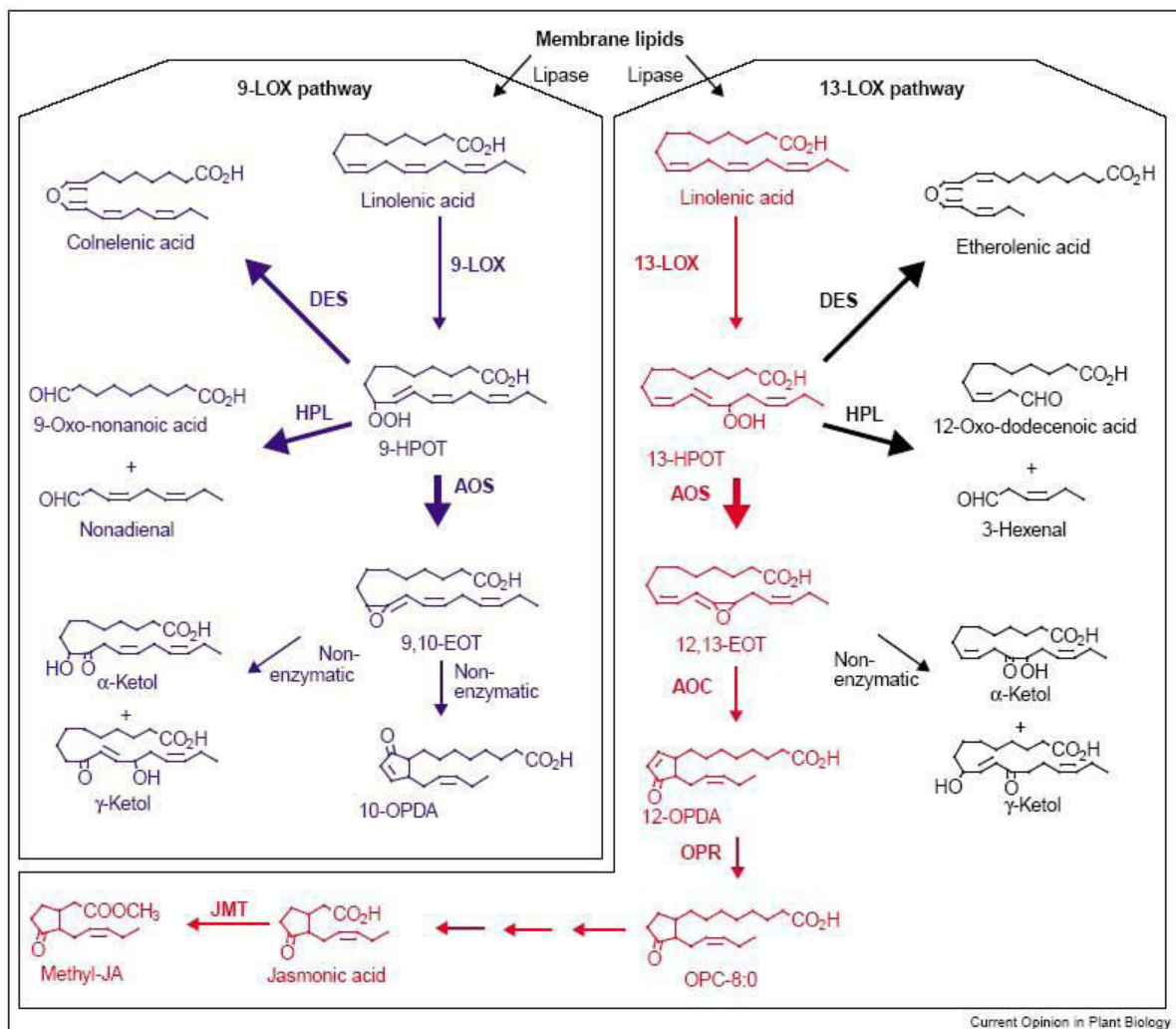


Figure 20 : Description des voies 9-LOX et 13-LOX.

### 2.1.6 La voie des 9-LOX

Malgré les progrès considérables dans la mécanismes de défense liés aux oxylipines dérivées de 13-LOX, la fonction des 9-LOXs et de leurs métabolites est actuellement peu claire (Figure 20). Les 9-LOX catalysent l'incorporation de l'oxygène moléculaire dans les acides gras polyinsaturés (AGPIs) comme l'acide linoléique (LA) et l'acide linoléique (LeA) dans la position 9 pour produire les 9-HPODE (acide hydroperoxyoctadécadiénoïque) et les 9-HPOTE (acide hydroperoxyoctadécatriénoïque) (Feussner et Wasternack 2002). Ces hydroperoxydes, instables et toxiques, sont ensuite transformés en molécules moins réactives (phyto-oxylipines), des molécules de défense ou de signalisation (Fammartino *et al.*, 2007; Göbel *et al.*, 2001, 2002, 2003). La synthèse de ces molécules fait intervenir la famille des CYP74 (Allène oxyde synthase (AOS), CYP74A, Hydroperoxyde lyase (HPL), CYP74B et C et Divinyl ester synthase (DES), CYP74D), des P450 atypiques fonctionnant sans apport d'oxygène et sans pouvoir réducteur. En fait, les CYP74 utilise les hydroperoxydes comme donneur d'oxygène et de substrats (Itoh et Howe, 2001).

Des mutant ou des plantes transgéniques affectées dans la synthèse, la signalisation, ou la perception des oxylipines montrent des réponses modifiées aux agents pathogènes et, sur la base de ces phénotypes, des rôles de signalisation et antimicrobiens ont été suggérés pour plusieurs de ces oxylipines (Shah 2005 ; Prost *et al.*, 2005 ; Weber *et al.*, 1999). La voie 9-LOX peut être stimulée sous différentes conditions de stress. Plusieurs oxylipines 9-LOX-dépendantes, y compris les 9-HPO, 9-hydroxydes, acides colnéléiques (CA) ou colnéléiques (CnA), des trihydroxyoxylipines dérivées des (9-HPOD) et (9-HPOT), s'accumulent dans le tabac ou la pomme de terre en réponse aux traitements d'éliciteur ou à l'infection par des agents pathogènes (Rustérucchi *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1999; Gobel *et al.*, 2001, 2002 ; Stumpe *et al.*, 2001). La production de 9-HPO a en effet été mise en évidence chez le tabac élicité par la cryptogéine (Rustérucchi *et al.*, 1999) ainsi que chez le cotonnier et la pomme de terre développant une RH (Jalloul *et al.*, 2002 ; Göbel *et al.*, 2003). Le métabolisme de oxylipines de type (9S) LOX-dépendant a été induit chez le tabac infecté par le VMT ou par une race avirulente de *Ralstonia solanacearum* ; ces hydroperoxydes se sont avérés suffisants pour initier la mort programmée de cellules et la RH (Montillet *et al.*, 2002 ; Cacas *et al.*, 2005). La présence de trihydroxy-acides gras, résultant de l'action d'une époxy-alcool synthase sur des 9- HPOD(T) E a été révélée dans des feuilles de pomme de terre et de tabac inoculées avec une souche bactérienne avirulente (Göbel *et al.*, 2001 et 2002 ; Hamberg *et al.*, 2003). La production de 9-HOT dans le système racinaire d'*A. thaliana* a également été démontré avec comme fonction possible de modifier les parois cellulaires et de bloquer la progression de parasites (Vellosillo *et al.*, 2007). Chez le maïs, une 9-Lox serait à la fois impliquée dans la croissance racinaire et la résistance aux nématodes (Gao *et al.*, 2008a). La

surexpression d'une 9-LOX dans le tabac a augmenté la résistance à *Phytophthora parasitica*. (Ménesaffrané *et al.*, 2003) et l'expression d'un gène 9-LOX précède l'apparition de RH chez la pomme de terre infecté par *P. infestans* (Kolomiets *et al.*, 2000), suggérant le rôle important de 9-LOXs dans la défense en synthétisant des molécules antifongiques ou signaux contre le pathogène.

Des oxylipines dérivées de la voie des 9-LOX, comme les 9-HPOD/Ts, 9-HOD/Ts, 9-KOD, et 9- (9-KOT) ont des propriétés anti-fongiques et anti-oomycètes *in vitro* et une certaine activité antibactérienne comme dans le cas des oxylipines formées par la branche issue de l'activité HPL (Prost *et al.*, 2005). Les HPL du groupe CYP74C catalysent la formation d'acide 9-oxononanoïque et de 3(Z)-nonéanal ou de (3Z, 6Z)-nonadiéanal suivant que l'HPX métabolisé est issu des substrats 18:2 ou du 18:3, respectivement. Deux gènes codant des enzymes appartenant au groupe CYP74C ont été clonés chez le melon et le concombre et sont fortement spécifiques des 9-HPODE et 9-HPOTE, mais étaient également capables de cliver dans une moindre mesure des 13-HPX. Comme c'est le cas de l'hexéanal, les aldéhydes à 9 atomes de carbone peuvent subir des conversions secondaires et sont dotées aussi de propriétés anti-microbiennes (Grechkin, 1998).

La voie gouvernée par la DES qui a été détectée chez les *Solanaceae* transforme, chez les tubercules de pomme de terre, les 9-HPO d'acides gras en CA et CnA aux activités antimicrobiennes ou de défense contre *P. infestans* (Weber *et al.*, 1999 ; La Camera *et al.* 2004 ; Shah 2005). D'autres études ont révélé que les CA et CnA peuvent empêcher la germination des zoospores de *P. parasitica* var. *nicotianae* *in vitro*, indiquant qu'ils peuvent être de bons candidats dans la défense (Prost *et al.*, 2005). Dans le tabac, *NiDES1* (9-DES) et *NiLOX1* (9-LOX) agissent ensemble et forment des divinyl ether en réponse à *P. parasitica* var. *nicotianae*. Il s'avère ainsi que la voie 9-LOX/9-DES est fortement induite chez les solanacées en réponse aux agents pathogènes, notamment oomycètes, confirmant la contribution *in vivo* des oxylipines dérivées des 9-LOX dans la résistance et leur rôle potentiel de phytoalexines (Fammartino *et al.*, 2007).

Des études *in vitro* ont établi que la branche AOS de la voie 9-LOX dirigeait la production de  $\gamma$ -cétol et d'acide 10-oxo-phytodiénoïque ou 10-OPDA (Stumpe *et al.*, 2006). Le premier gène codant une AOS appartenant au groupe CYP74C a été identifié chez la tomate. Ce dernier a été cloné et la protéine recombinante produite chez *E. coli*. Cette enzyme était capable de métaboliser les 13- et 9- HPOD (T) E était environ 10 fois plus active sur les isomères 9 que sur les isomères 13. La caractérisation des produits de la réaction a confirmé les données précédemment acquises. Enfin, une étude génétique effectuée chez la pomme de terre a suggéré que le 10-OPDA régulerait le développement du tubercule (Kolomiets *et al.*, 2001). Afin de déterminer le rôle des 9-AOS, il semble important de mettre en évidence l'accumulation de ces produits *in planta*.

Prises ensemble, ces données fournissent une bonne base pour un rôle spécifique de 9-LOXs et de leurs dérivés comme facteurs de résistance.

## **2.2 Hypothèse sur le rôle des oxylipines électrophiles dans la mort cellulaire hypersensible**

Parmi les oxylipines issues des voies 9- et 13-LOX et du processus d'autoxydation, certaines possèdent un groupement carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé et répondent de ce fait à la définition des RES (Reactive electrophile species) (Alméras *et al.*, 2003). Outre le fait que les RES sont toutes potentiellement capables d'induire l'expression de gènes de défense, ces composés électrophiles en raison de leur structure chimique peuvent également former des adduits de Michael avec d'autres molécules (Alméras *et al.*, 2003). Bien qu'aucune preuve expérimentale de l'existence des adduits de Michael n'ait été apportée chez les végétaux, il n'est pas interdit d'envisager que de tels conjugués soient formés lors de la RH.

### **C. Les interactions cotonnier - *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum***

Le cotonnier est une plante dicotylédone dialypétale de l'ordre des Malvales, de la famille des Malvacées et de la tribu des Hibiscées. Le genre *Gossypium* renferme quatre espèces cultivées et une trentaine d'espèces dites sauvages (Parry, 1982). Les espèces cultivées comprennent:

- les espèces diploïdes ( $2n=26$ ) originaires d'Afrique et d'Asie
- les espèces tétraploïdes ( $4n=52$ ) originaires d'Amérique, dont *G. hirsutum* et *G. barbadense*.

Ces deux espèces fournissent 95% des fibres commercialisées sur le plan mondial.

La culture cotonnière est particulièrement importante pour de nombreux pays en raison de son impact social et économique tant dans les secteurs agricoles qu'industriels. Plus de 70 pays, les Etats-Unis en tête, exploitent actuellement le cotonnier dont la production mondiale annuelle en fibre est évaluée à 21 millions de tonnes. L'Afrique subsaharienne francophone (Mali, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Sénégal, Togo, Bénin, Tchad, Cameroun, RCA) plantait en 1995 près de 1,5 millions d'hectares et produisait 1,6 millions de tonnes de coton-graine et 650 000 tonnes de fibre. L'Afrique francophone est ainsi le troisième exportateur mondial de fibres derrière les Etats-Unis et l'Ouzbékistan (Texier, 1996). En 2000, la Syrie était le second pays de production de coton par unité de surface (1425 kg/h) et le 10<sup>ème</sup> pour la production totale, générant des revenus supérieurs à 1 milliard de dollars ; dans ce pays, la culture cotonnière est la première culture industrielle.

Actuellement, l'exploitation du cotonnier ne se limite plus à la seule production de fibre, puisque la graine est une source importante de matière première alimentaire pour l'homme et le bétail. L'huile de cotonnier représente aujourd'hui l'essentiel de la consommation d'huile

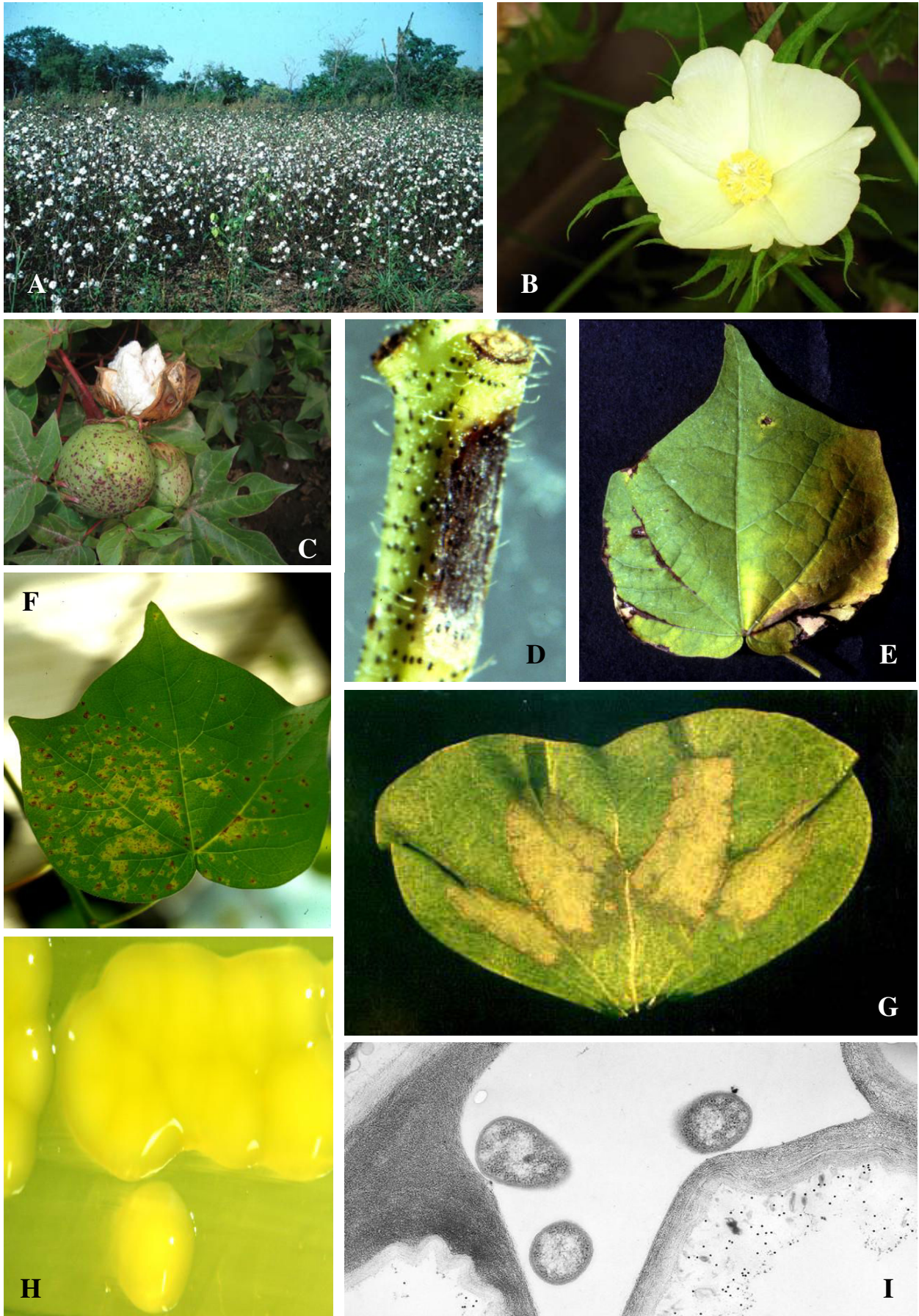
alimentaire dans les pays africains. Dans ces pays, à l'exception du Sénégal, l'huile de cotonnier s'est maintenant largement substituée à celle d'arachide dont la trituration industrielle a disparu. Cette évolution n'a rien d'étonnant, puisqu'un hectare de cotonnier, outre 400 kg de fibres, produit environ 120 litres d'huile et 250 kg de tourteaux. De plus, les farines de coton constituent une matière protéagineuse de choix (avec une teneur en protéines pouvant atteindre 50%) pour l'alimentation animale, servant ainsi de base essentielle à une modernisation de l'élevage. On notera que l'huile de cotonnier est également utilisée comme matière première de l'industrie savonnaire, ou pour le fonctionnement de certains types de moteurs, comme cela a été expérimenté au Mali et au Tchad (Texier, 1996).

### **1. Les maladies du cotonnier**

Le cotonnier peut être attaqué par de nombreux ravageurs et parasites. Le spectre des ravageurs inféodés au cotonnier est très vaste avec plus de 70 espèces d'arthropodes (puçerons, aleurodes, punaises...) auxquelles s'ajoutent les acariens, les diploptides et les nématodes. Conjointement ou indépendamment des dégâts causés par les ravageurs, les pertes de récoltes consécutives aux maladies atteignent au moins 30% du rendement jusqu'à la destruction quasi totale du potentiel de production. Le nombre et l'importance des maladies varient selon les zones climatiques, les espèces cultivées et le type d'agrosystème. Dans les régions avec une saison froide, la maladie la plus importante est la verticilliose tandis que dans les zones tropicales, il s'agit de la fusariose, de la bactériose, des pourritures de capsule et des maladies à transmission biologique (viroses, maladies à mycoplasmes). Les agents pathogènes les plus fréquemment recensés sont *Colletotrichum gossypium* (Soughe), *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Verticillium dahliae* et *Xcm*.

Parmi les maladies les plus dommageables, la bactériose du cotonnier (ou brûlure bactérienne) causée par *Xcm* est présente dans tous les pays producteurs de coton ; en Afrique, elle est souvent la maladie la plus importante.





**Figure 21 :** La bactériose du cotonnier. A : parcelle de cotonnier en Côte d'Ivoire. B : fleur *Gossypium hirsutum*. C : fruit et capsule de *Gossypium hirsutum* en Syrie. D, E : symptômes de blackarm sur tige et feuille. F : symptômes de chlorose sur feuille. G : lésions nécrotiques hypersensibles sur cotylédon de *Gossypium hirsutum* var Réba B50. H : colonies de *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. I : bactérie en position intercellulaire dans un mésophylle de cotylédon de *Gossypium hirsutum* var Réba B50 (microscope électronique à transmission ; x 30000)



## 2. *Xcm* : agent de la bactériose du cotonnier (figure 21)

### 2.1. Taxonomie, morphologie et physiologie

La bactérie responsable de la bactériose du cotonnier fut appelée à l'origine *Ps. malvacearum* par Smith (1920), puis *Bacterium malvacearum* et, enfin, *X. campestris* pathovar *malvacearum* (E.F.Smith) Dye (Dye *et al.*, 1980), qui demeure le nom encore généralement utilisé malgré un récent changement de nomenclature (*X. axonopodis* pathovar *malvacearum*). Le genre *Xanthomonas* regroupe un ensemble de bactéries phytopathogènes qui affecte un large spectre d'hôtes (124 espèces végétales monocotylédones, 268 dicotylédones).

La bactérie a la forme d'un bâtonnet de 0.3-0.6 x 1.3-2.7 µm, Gram-négative et possède un seul flagelle polaire. Son métabolisme respiratoire est aérobie strict. Sur le milieu nutritif (YPG agar), *Xcm* développe des colonies jaunes, muqueuses et brillantes. Cet aspect caractéristique du genre *Xanthomonas* est dû à la présence de pigments caroténoïdes non diffusibles (xanthomonédines) associées à un polysaccharide extracellulaire appelé xanthane.

### 2.2. Le cycle de la bactérie

L'inoculum primaire nécessaire au développement de la maladie a pour origine la semence et les résidus de culture. Le cycle de la bactérie présente trois phases:

- une **phase de développement épiphyllé** sur les organes aériens où se constitue l'inoculum nécessaire à la contamination interne des tissus ;

- une **phase infectieuse** durant laquelle la bactérie pénètre dans les feuilles par les stomates et les blessures. Après la colonisation des chambres sous-stomatiques, la bactérie progresse dans les espaces intercellulaires en détruisant les parois cellulaires du mésophylle spongieux et du parenchyme palissadique (Al-Mousawi *et al.*, 1982 ; Massey, 1929 ; Weindling, 1948 ; Thiers et Blank, 1951) ;

- une **phase de survie** où la bactérie se conserve dans la semence et les débris végétaux. *Xcm* survit très peu de temps dans le sol en l'absence de ces débris (Massey, 1930a, b). Les sources principales d'infections aux champs sont les graines contaminées, les débris végétaux au sol et les anciens plants contaminés non arrachés (Brinkerhoff et Hunter, 1963 ; Brinkerhoff et Fink, 1964). Dès la germination des graines, la bactérie peut adhérer au cotylédon par sa coiffe basale, puis coloniser le limbe et déclencher la maladie dans la parcelle au stade plantule ; la maladie se propage alors facilement sous l'action conjointe du vent et de la pluie. La bactérie peut se maintenir pendant de longues périodes d'un cycle cultural à l'autre, et surtout dans la graine ce qui explique le caractère endémique de la maladie dans de nombreuses zones de culture.

## 2.3 Variabilité de l'agent pathogène

La variabilité du pouvoir pathogène de la bactérie est importante et a fait l'objet de nombreuses études (Brinkerhoff, 1963). En Afrique de l'Est, Arnold et Brown (1968) poursuivant les travaux de Crosse (1963) attribuent la variabilité du pouvoir pathogène de *Xcm* à une variation continue de la virulence ne justifiant pas la création de races définies. Ces résultats contradictoires sont à confronter avec ceux de Gabriel *et al.* (1986) et de De Feyter *et al.* (1992) qui démontrent que l'interaction entre les races de *Xcm* et le cotonnier relève du modèle conventionnel gène pour gène. La mise au point aux Etats-Unis d'une gamme différentielle de cotonnier de l'espèce *G. hirsutum* avec différents gènes majeurs de résistance (Hunter *et al.*, 1968 ; Brinkerhoff *et al.*, 1984) a permis l'identification de 20 races (Follin *et al.*, 1988). Chez *Xcm*, six gènes d'avirulence (*Avr*) ont été clonés et l'analyse génétique des interactions *Xcm* -cotonnier montre que chaque gène *Avr* interagit spécifiquement avec le gène de résistance correspondant chez la plante. Sur la base de cette étude et des résultats obtenus chez d'autres interactions bactérie-plante où le modèle gène pour gène s'applique, il a été suggéré que le mécanisme principal d'apparition de nouvelles races soit dû à des recombinaisons inter et intragéniques au niveau des gènes *Avr* de la bactérie (De Feyter *et al.*, 1992). L'apparition en Afrique (Burkina Faso, Soudan, Tchad), au début des années 80, d'une nouvelle race de *Xcm* (la race 20) capable de surmonter toutes les sources de résistances connues pourrait ainsi s'expliquer. Sur un plan pratique, cette approche confirme la validité de la notion de race chez *Xcm* que l'on peut discriminer par des inoculations sur une gamme de variétés différentielles (Hunter *et al.*, 1968).

Enfin, une exploration de la diversité de la virulence de *Xcm* en Syrie vient de débiter. Elle porte sur une étude d'une population de cette bactérie en provenance de 6 régions de culture du cotonnier dans ce pays afin de caractériser sa structure et de tenter de comprendre le comportement des génotypes de cotonnier déployés au champ dans la perspective de proposer des alternatives de lutte contre la bactériose qui connaît une recrudescence dans la région (Jalloul *et al.*, non publiés).

## 3. La bactériose du cotonnier (figure 21)

### 3.1. Historique et répartition de la maladie

La bactériose du cotonnier serait apparue en Inde (Knight, 1948). Cependant, la première description précise de la maladie a été faite aux Etats-Unis par Atkinson (1891). L'auteur identifie trois types de symptômes:

- les taches anguleuses huileuses ("Angular leaf spots") sur les feuilles
- les nécroses sur les tiges (black arm)

- les lésions sur fruits.

Smith (1920) réussit à reproduire les symptômes de la maladie en inoculant les feuilles et les graines avec des suspensions provenant de graines infectées. Il en déduit qu'un même micro-organisme était la cause des deux symptômes. Edgerton (1912) démontra que les lésions sur feuilles, fruits et tiges constituent la symptomatologie normale de la maladie. Les premières études épidémiologiques démontrèrent que, dans une plantation, la dispersion de la maladie était favorisée par l'action conjointe de la pluie et du vent (Faulwetter, 1917). L'origine bactérienne de la maladie ne fut déterminée avec certitude qu'en 1930 au Soudan par Massay (1930a) sur des cultivars de *G. barbadense*. D'autres études épidémiologiques furent menées simultanément au Soudan par Findlay (1928) et Stoughton (1933). A la suite de ces travaux, la maladie a été signalée dans de nombreuses régions d'Afrique (Ouganda, Afrique centrale) où la culture cotonnière était en cours d'intensification (Hansford, 1932). Aux alentours de 1950, avec le développement de la culture cotonnière et son intensification, notamment aux Etats-Unis, il est apparu que la bactériose constituait un facteur limitant de la production. En effet, la maladie était détectée dans les principales zones de culture aux Etats-Unis (Schnathorst *et al.*, 1960), en Inde (Verma, 1986) et en Afrique. Pour contrôler la bactériose, seule la lutte génétique s'est révélée efficace ; le premier programme de sélection pour la résistance est alors initié au Soudan par l'Institut de recherche sur le cotonnier (Knight, 1946). Actuellement, la bactériose du cotonnier est recensée dans tous les pays du monde où cette plante est cultivée (CMI distribution Map N°57; Hillocks, 1992)

### **3.2. Les symptômes aux champs causés par *Xcm***

Le cotonnier peut être contaminé par la bactériose dès le jeune plant, et à tous les stades de son développement. Pour cette maladie, on distingue schématiquement quatre symptomatologies à savoir les taches foliaires anguleuses (angular leaf spot), les nécroses sur tiges non aoûtées (black arm), les lésions sur les capsules (boll rot) et la brûlure des plantules. Ces quatre phases sont induites par le même isolat de *Xcm*. Les symptômes varient selon les organes affectés. Sur les semis et les jeunes plantules, la maladie s'exprime dès le stade cotylédonnaire sous forme de macules huileuses qui provoquent la déformation du limbe. De petites taches anguleuses huileuses deviennent visibles à la surface du cotylédon, en général le long des nervures. Les lésions s'étendent et le cotylédon se recroqueville. Dans des conditions favorables à la maladie, l'infection s'étend du cotylédon jusqu'à la tige par le pétiole, entraînant la mort de la plantule. Les lésions peuvent également apparaître le long d'une nervure avec, ou en l'absence, de taches anguleuses précises (vein-blight). L'infection vasculaire démontrée par Bhagwat et Bhide (1962) en Inde et par Wickens (1956) en Afrique de l'Est permet d'expliquer les nécroses le long des nervures et des tiges. Des études histologiques ont démontré que la destruction des tissus est souvent restreinte au parenchyme (Thiers et Blanck, 1951). Rarement, il se produit une vraie

infection vasculaire à l'image d'autres *Xanthomonas* (Boher *et al.*, 1996), permettant à la bactérie de progresser dans toute la plante (Rolfs, 1935 ; Bhagwat et Bhide, 1962).

La nécrose des tiges (black arm) peut entraîner le dessèchement des sommités et favoriser la chute des branches fructifères sous l'effet du vent (Verma et Singh, 1970). C'est le symptôme le plus sévère de la bactériose.

La bactériose affecte également les bractées, et provoque la chute des boutons floraux ou des jeunes fruits. Sur les fruits âgés, l'infection est visible à l'apparition de petites taches huileuses, devenant noires et pouvant atteindre 10 mm de diamètre. Le développement de la maladie sur les fruits assure la contamination externe et interne des graines. Cette contamination peut être favorisée par des insectes piqueurs qui introduisent la bactérie dans la graine par leur stylet (Brinkerhoff et Hunter, 1963). La présence de *Xcm* dans la semence joue un rôle essentiel dans le développement de la maladie en assurant la pérennité de l'inoculum primaire d'un cycle cultural à un autre.

### **3.3. L'incidence de la bactériose sur la culture cotonnière**

La bactériose favorise la perte de vigueur du plant de cotonnier, mais les problèmes les plus importants sont l'avortement des fleurs et la chute de la branche fructifère. Au Soudan, El-Nur (1970) rapporte que la bactériose entraîne généralement une perte de 20% aux champs, qui peut atteindre 77% lorsque l'infection touche la plante au début du cycle cultural. Au nouveau Mexique en 1949, une épidémie causa une perte estimée de 35 à 59% (Leyendecker, 1950). Dans le Nord-Ouest de l'Inde, en culture irriguée, l'estimation des pertes varie de 5 à 20% (Verma et Singh, 1971). Tarr (1958) évalue les pertes dans les autres pays asiatiques, incluant la Chine, le Pakistan et l'URSS à 20-30%. En plus de son incidence directe sur les rendements, la maladie étant transmissible par la semence, l'utilisation des graines contaminées permet la pérennisation de la maladie dans les zones de culture et expose les producteurs aux risques d'introduction d'une nouvelle race.

### **3.4 Les moyens de lutte connus contre la bactériose**

En culture cotonnière, peu de maladies sont contrôlées par la lutte chimique. C'est le cas de la bactériose, pour laquelle l'amélioration des techniques culturales (dates de semis, rotation des cultures) et la désinfection de la semence ne suffisent pas à empêcher le déclenchement des épidémies. Les graines contaminées constituent très souvent la source d'inoculum primaire nécessaire à la contamination des organes aériens et au démarrage du processus infectieux. Plusieurs méthodes de traitement des graines ont ainsi été développées en Afrique et aux USA dès les années 1950 pour réduire les taux de contaminations. La méthode la plus communément utilisée est l'arrosage des graines par l'acide de délitage (acide sulfurique, 1% de formaldéhyde et composés mercuriques remplacés graduellement par l'oxyde de cuivre) (Wickens, 1953; Logan,

1960). Cette méthode de lutte très efficace élimine les contaminations de surface, et permet un contrôle efficace et suffisant de la maladie dans des pays comme la Californie, où le climat est trop sec et ne favorise pas l'expression de la bactériose. (Schnathorst *et al.*, 1960). D'autres composés comme l'oxanthiine, la carboxine et l'oxycarboxine (Vina et Granada, 1986), ou encore le bronopol (Dransfield, 1969; Hillocks, 1984) apparaissent pour être efficaces contre l'attaque bactérienne.

Les traitements chimiques des graines présentent des limites, en ce sens qu'ils ne permettent pas d'éliminer l'inoculum interne à la graine, à moins d'être associés à un antibiotique comme la streptomycine et la tetracycline (Verma *et al.*, 1975). Un traitement chimique sur les feuilles améliore aussi la protection des cultures. Des composés à action systémique, principalement à base d'antibiotiques donnent les meilleurs résultats. Verma (1986) conclue dans sa revue sur le contrôle chimique de la bactériose que la technique la plus sûre est la désinfection chimique des graines, suivi de traitements foliaires 6 à 8 semaines après la plantation. La lutte chimique, outre son coût, fait appel à une technologie difficilement compatible avec les systèmes d'exploitation peu mécanisés que l'on rencontre en Afrique tropicale. Pour ce type d'agrosystème, l'amélioration des techniques culturales associée à l'introduction de variétés résistantes constitue la stratégie de lutte la plus appropriée. Toutefois la désinfection de la semence par des produits bactéricides pourrait réduire de manière significative l'infection primaire et favoriser le contrôle de la maladie.

Les connaissances acquises sur la biologie de *Xcm* ont permis de proposer des techniques culturales dont l'objectif est de rompre le cycle de la bactérie au cours de sa phase de survie (graines, déchets de culture). Ainsi, la viabilité de *Xcm* est rapidement perdue si les résidus de feuilles sont enterrés. Brinkerhoff et Fink (1964) notent que la période de survie de la bactérie est plus courte dans un sol humide que dans un sol sec, et recommandent la collecte des débris et de leur enfouissement dans un sol humide (Verma *et al.*, 1977). La bactérie ne pouvant survivre plus de 12 mois, un bon contrôle de la maladie consiste à effectuer des rotations culturales.

Verma et Singh (1974a, b) rapportent qu'une pré-inoculation de feuilles de variétés sensibles avec une souche avirulente de la bactérie, des bactéries tuées par la chaleur ou encore avec des bactéries de surface de la feuille 20 jours avant l'inoculation avec une souche virulente, retardent l'apparition des symptômes, et réduisent le nombre de lésions par feuille (utilisation des capacités de la plante à déclencher une résistance systémique acquise). Bien que cette méthode ne soit pas encore utilisée à ce jour, beaucoup de travaux ont été effectués sur cette technique de pré-inoculation (Sinha et Verma, 1983; Verma *et al.*, 1983).

Dès le début de l'intensification de la culture cotonnière, la recherche de variétés résistantes a constitué l'une des préoccupations majeures des chercheurs. L'utilisation de ces variétés résistantes se heurte cependant à la grande diversité et adaptabilité des agents pathogènes, compromettant ainsi la stabilité de ces résistances. Quelques variétés résistantes diploïdes et tétraploïdes de cotonnier, obtenues par transfert de gènes de résistance dérivés d'autres espèces de *Gossypium*, sont cultivées dans certains pays. La sélection a pour objet d'obtenir non seulement de meilleurs comportements aux champs, mais aussi un produit de plus grande valeur. Le premier programme de lutte contre la bactériose a été mené au Soudan, où la variété de cotonnier Sakel (*G. barbadense*) sensible à *Xcm* produit une fibre de haute qualité. Après avoir identifié des gènes de résistance sur d'autres variétés, Knight (1954a, b) et Innes (1966) ont transféré ces gènes à des plants de la variété Sakel. Dans tous les cas le contournement rapide de la résistance conféré par des gènes majeurs utilisés seuls a conduit les sélectionneurs à utiliser des associations de gènes de résistance. Cette stratégie est toujours largement utilisée dans le monde entier. En Afrique, cependant, l'apparition de la race 20 de *Xcm*, capable de surmonter toutes les sources de résistance et dont les associations de gènes majeurs réactualisent le problème de la bactériose (Hillocks, 1992), dynamise la recherche de nouveaux facteurs de résistance. La remise en question de la lutte génétique par l'apparition récurrente de nouvelles races de *Xcm*, montre qu'il n'existe pas actuellement de méthodes de protection permettant l'éradication de *Xcm* des champs de cotonniers.

#### **4. Nature et mécanismes de la résistance du cotonnier à *Xcm* : état de l'art**

Une variabilité génétique considérable de la résistance à la bactériose existe dans le génome *Gossypium*. Knight et Clouston (1939) démontrèrent les premiers l'héritabilité de la résistance du cotonnier au Soudan. Actuellement, après un screening chez les variétés diploïdes et tétraploïdes, 18 gènes de résistance (nommés gènes-B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>...) ont été identifiés dans le génome *Gossypium* (Knight, 1944, 1948, 1950, 1953a, b, 1954a, b, 1963 ; Saunders et Innes, 1963 ; Innes, 1966 ; Green et Brinkerhoff, 1956 ; Girardot *et al.*, 1986). Dans le cas de la bactériose du cotonnier, pour lequel l'hypothèse de la relation gène pour gène est admise (De Feyter *et al.*, 1992), la résistance du cotonnier aux différentes races de *Xcm* est dépendante des différentes combinaisons des gènes de résistance B et des gènes d'avirulence (*Avr*) de *Xcm*. Elle se traduit par le déclenchement d'une réaction d'hypersensibilité (RH), stratégie de défense hautement efficace chez les plantes (Nicole *et al.*, 1998 ; Delannoy *et al.*, 2005). Parmi les gènes B, on distingue des gènes récessifs, dominants, ou partiellement dominants, dont l'action dépend de la présence des autres gènes B. En Afrique francophone, la résistance à la bactériose a été obtenue en introduisant chez les variétés

commerciales deux associations de gènes  $B_2B_3$  et  $B_9LB_{10}L$  découverte chez *G. hirsutum* (Bayles *et al.*, 2003). Cette association de gènes confère une résistance foliaire totale à toutes les races de *Xcm*, excepté à la race 20. Mais, par exemple, le gène  $B_7$  influence négativement l'association des gènes  $B_2B_3$  en présence de la race 12 (Hillocks, 1992). De plus, selon les gènes impliqués, certains plants peuvent manifester une résistance à *Xcm* dans un organe en particulier ou à un âge précis. La résistance conférée par ces associations de gènes majeurs se traduit, après inoculation de l'hôte, par le déclenchement d'une RH. Grâce à cette réaction, *Xcm* ne peut plus progresser à l'intérieur de la plante (Nicole *et al.*, 1998).

Pour nos recherches, le choix du génotype hôte s'est porté sur le cultivar Réba B50 de *G. hirsutum*, porteur des gènes  $R B_2B_3$  et celui des génotypes bactériens sur les races 18 (avirulente) et 20 (virulente) de *Xcm*. A ce jour, plusieurs réponses adaptatives du métabolisme des cellules infectées de cotylédons de cotonniers résistants ont été identifiées et associées à l'établissement de la RH. La plus précoce d'entre-elle est le choc oxydatif qui se distingue par la production d' $O_2^-$  (3h post-infection) générée par une peroxydase cationique apoplastique, identifiée par IEF, cytochimie ultrastructurale (Martinez *et al.*, 1998) et immunocytochimie (Delannoy *et al.*, 2002).  $O_2^-$  est rapidement dismuté en  $H_2O_2$  (3 à 6h après inoculation) (Martinez *et al.*, 1998 ; ) par une SOD dont le pic d'activité se situe 4h post-infection (Voloudakis *et al.*, 2006). Ces auteurs ont également montré que l'accumulation d'AS est induite par  $H_2O_2$  infiltré dans les feuilles (Martinez *et al.*, 2000). En outre, l'infiltration d'AS dans les cotylédons contrôle rétroactivement l'activité de la peroxydase cationique apoplastique. Ces résultats suggèrent un éventuel contrôle du choc oxydatif par l'AS et une induction de la synthèse d'AS par  $H_2O_2$  *via* l'activation des gènes du métabolisme des composés phénoliques ; ce mécanisme demande cependant à être vérifié *in planta*. L'AS est ensuite produit au voisinage des tissus infectés, puis dans la plante entière, 24 post-infection, révélant un effet SAR, traduit par une réduction des populations bactériennes inoculées tardivement sur des plantes pré-infectées (Martinez *et al.*, 2000). L'AS et  $H_2O_2$  sont deux molécules capables d'induire une augmentation d'activités peroxydases localement et systématiquement (Martinez *et al.*, 2000). Plusieurs gènes de peroxydases de cotonnier ont ainsi été clonés au laboratoire (Assigbetsé *et al.*, 1999 ; Delannoy *et al.*, 2003, 2004). L'un deux présente une activité transcriptionnelle différentielle précoce dans les plantes résistantes, ce qui en fait un bon candidat pour expliquer la génération d' $O_2^-$  (Delannoy *et al.*, 2003).

Les métabolites secondaires antimicrobiens les plus importants chez le cotonnier sont les terpénoïdes, sous forme d'aldéhydes, uniques dans le genre *Gossypium*. Ils peuvent être préformés dans les glandes à pigment, ou être synthétisés *de novo* en réponse à une blessure, ou une infection. Une production de phytoalexines de type terpènes en réponse à *Xcm* a été mise en évidence

(Gorski *et al.*, 1995 ; Essenberg *et al.*, 1982, 1990). Deux phytoalexines (2-4-dihydroxycadalène et laciniline) ont été identifiées à partir de feuilles et de cotylédons de plants résistants attaqués par la bactérie, et synthétisées à un niveau suffisant pour inhiber l'agent pathogène au site d'infection (Essenberg et Pierce, 1994). Trois autres sesquiterpènes, les isomères cis et trans du 7-hydroxycalaménène-2-one, ainsi que le trans-7-hydroxycalaménène ont ensuite été isolés dans des extraits de cotylédon de cotonniers résistants durant la période de biosynthèse de phytoalexines sesquiterpénoïdes, après inoculation par *Xcm* (Davila-Huerta *et al.*, 1994). Certaines de ces phytoalexines émettent une fluorescence verte importante dans les cellules en cours de RH ; elles ont été caractérisées sous la forme monomère ou polymère (Essenberg *et al.*, 1992a, b). Au plan moléculaire, le gène de la sesquiterpène cyclase, activé en amont de la synthèse de ces phytoalexines, est transcrit 20h après infection (Davis *et al.*, 1996). Enfin, une production *de novo* de flavonoïdes a également été mise en évidence autour des sites d'infection pendant la réaction incompatible 9h après inoculation, sans qu'un effet antimicrobien de ces phénols ait été caractérisé (Dai *et al.*, 1996). Récemment, une analyse chimique a été conduite sur des extraits de cellules épidermiques infectées révélant que des molécules glycosylées de type anthocyanidine (cyanidine-3-O- $\beta$ -glucoside) et un flavonol jaune, la quercétine, s'accumulent au contact des sites HR. Ces pigments auraient un rôle protecteur des cellules vivantes non infectées (Edward *et al.*, 2008).

L'impact potentiel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la dégradation des membranes d'une cellule en RH a conduit à la caractérisation du phénomène de peroxydation des lipides membranaires. L'analyse des produits de dégradation des lipides du cotonnier infecté a permis d'identifier la nature enzymatique de cette oxydation (Jalloul *et al.*, 2002). Un gène codant une lipoxygénase de type 9 (*GbLOX1*) a de ce fait été cloné ; son profil de transcription est spécifique aux tissus résistants (Jalloul *et al.*, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007). Le fonctionnement des lipoxygénases est étroitement dépendant de celui de lipases (patatine) qui les pourvoient en substrats ; c'est le cas du gène *GbLOX1* activé de manière synchrone au gène *Ghpat1* (Cacas *et al.*, 2008). Le gène *GbLOX1* est maintenant considéré comme un marqueur de choix de la résistance du cotonnier à *Xcm* ; il est en effet exprimé de manière différentielle dans diverses combinaisons gène R – gène *avr* (Sayegh-Alhmdia *et al.*, 2008). L'analyse fonctionnelle du gène *GbLOX1* est en cours de réalisation et devrait confirmer son rôle clé dans l'installation de la RH du cotonnier à *Xcm* (Chapitre 2).

C'est cependant vers la compréhension des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la résistance du cotonnier à *Xcm* que les recherches sont orientées depuis quelques années. La peroxydation des lipides membranaires et la transformation de leurs produits de dégradation représentent le métabolisme des oxylipines dont l'une des voies, celle des



octadécanoïdes, conduit à la synthèse de l'acide jasmonique (AJ), hormone clé dans la résistance des plantes (Kazan et Manners, 2008). Dans l'interaction incompatible étudiée, l'AJ est produit très tôt (90 min après infection) en amont des événements majeurs décrits ci-dessus (Jalloul, 2002 ; Delannoy *et al.*, 2005). Cette hormone est capable d'activer la transcription du gène *GbLOX1* et celle d'une lipoxygénase de type 13 (Marmey *et al.*, 2007). Une approche pharmacologique a confirmé ces résultats (Jalloul, résultats non publiés). L'analyse moléculaire du gène *GbLOX2*, codant une 13-lipoxygénase, qui est transcrit très tôt après l'infection, devra confirmer s'il est à l'origine de la synthèse de l'AJ (Marmey *et al.*, résultats non publiés). En outre, l'action synergique (ou antagoniste) de l'AJ et de l'éthylène sur les gènes *GbLOX* est en cours d'étude (Champion *et al.*, résultats non publiés). Elle apportera des précisions quant aux voies de signalisation régulant l'activité du gène *GbLOX1* et complète l'étude sur les facteurs de transcription de la famille ERF du cotonnier en cours dans l'unité. Outre l'approche phylogénétique devant les comparer à ceux d'autres espèces végétales -riz et *Arabidopsis* -, elle a déjà montré que certains de ces facteurs sont jasmonate-dépendants, voire *Xcm*-dépendants (Champion *et al.*, 2009).

## D. Objectifs de la thèse

Mes travaux de recherche réalisés au sein de l'équipe « Mécanismes de la Résistance des Plantes » dans l'UMR « Résistance des Plantes aux Bioagresseurs » s'intègrent dans le cadre du rôle des processus oxydants dans la RH. A la lecture de la synthèse bibliographique non exhaustive décrite dans cette introduction, il apparaît que la peroxydation des lipides est un mécanisme clé dans l'établissement de la résistance spécifique. Les quelques événements identifiés au cours de la RH des cotylédons de cotonnier à *Xcm* s'inscrivent dans ce contexte :

- (1) intervention d'enzymes dans des mécanismes d'oxydation (peroxydase, SOD),
- (2) production de molécules susceptibles d'être impliquées dans des étapes d'oxydation ( $H_2O_2$  et  $O_2^-$ ),
- (3) peroxydation des lipides membranaires associées à une activité 9-lipoxygénase et à la transcription du gène *GbLOX1* et
- (4) production d'acide jasmonique en cours de confirmation.

La question qui m'a alors été posée concernait le(s) rôle(s) des lipoxygénases dans la stratégie de défense du cotonnier à *Xcm* et plus particulièrement celui du *GbLOX 1* associée à la peroxydation des lipides (Jalloul *et al.*, 2002). J'ai donc structuré mon mémoire de la manière suivante :

**le chapitre premier** rapporte la démarche qui m'a conduit à démontrer que la transcription du gène *GbLOX1* n'était pas uniquement liée à l'interaction entre le génotype Réba B50 du cotonnier et la race 18 de *Xcm*. J'ai ainsi testé plusieurs interactions gène *R* – gène *avr* durant lesquelles ont été suivis le phénotype de la résistance, l'activité LOX et la transcription du gène *GbLOX1*. Les résultats rapportés dans ce chapitre sont présentés sous la forme d'un article publié dans *Journal of Phytopathology* (Sayegh-Alhamedia *et al.*, 2008).

dans **le second chapitre**, j'ai entrepris une série d'expériences qui s'inscrit dans l'analyse fonctionnelle du gène *GbLOX1*. Si l'hypothèse selon laquelle les LOX, et donc le gène *GbLOX1*, jouent un rôle clef dans l'installation de la mort cellulaire de type HR (Goebel *et al.*, 2001, 2002 ; Rustérucci *et al.* 1999 ; Rancé *et al.*, 1998 ; Jalloul *et al.*, 2002 ; Montillet *et al.*, 2002 ; Cacas *et al.*, 2005 ; Marmey *et al.*, 2007), une approche génétique fondée sur la transformation du cotonnier devrait permettre d'apporter des éléments de réponses à cette question. Dans ce chapitre sont décrites les données acquises dans la mise en oeuvre de l'analyse fonctionnelle du gène *GbLOX1*.

Enfin, dans la partie de ce mémoire consacrée aux **Conclusions et Perspectives**, je me propose d'explorer certaines voies de recherches qui découlent de mes travaux et qui permettraient de mieux cerner la mort cellulaire de type RH chez le cotonnier en réponse à *Xcm*.

J'espère ainsi, par mon travail, contribuer à élucider la complexité d'une interaction entre une plante ligneuse annuelle de zone aride et une bactérie connue pour son aptitude à contourner la résistance au champ.

## CHAPITRE 1

### THE LIPOXYGENASE RESPONSE IS ASSOCIATED WITH RESISTANCE OF VARIOUS COTTON GENOTYPES TO THE BACTERIAL BLIGHT DISEASE

Sayegh-Alhamdia M., Marmey P., Jalloul A., Champion A.,  
Petitot A.S., Clérivet A. and Nicole M. 2008.

*Journal of Phytopathology* **156** : 542-549.

Les oxylipines sont des produits dérivés du métabolisme des acides gras qui régulent de nombreuses voies de signalisation de défense et du développement chez les plantes (Grechkin, 1998). Ces composés interviennent de diverses manières chez la plante comme molécules signal dans l'expression de gènes impliqués dans la défense ou dans des composés antimicrobiens (Hamberg *et al.*, 2003; Farmer, 1994 ; Blée, 2002; Farmer *et al.*, 2003).

De nombreuses données bibliographiques indiquent un rôle des LOX dans la résistance des plantes aux parasites. Chez le tabac, Rancé *et al.*, (1998) ont démontré que des plants transgéniques exprimant des ADNc de LOX en orientation anti-sens renferment une activité LOX très faible et possèdent une sensibilité importante à une souche avirulente de *P. parasitica nicotianae*. D'autres travaux ont mis en évidence une augmentation d'une activité spécifique de 9-LOX au cours de la RH chez le tabac induit par la cryptogéine (Rustérucci *et al.*, 1999) et sur suspension cellulaire de pomme de terre (Gobel *et al.*, 2001). D'ailleurs, des plants transgéniques de tabac dans lesquelles le gène *LOX1* est sur-exprimé, montrent une réduction de la sensibilité à *P. parasitica* (Mène-Saffrane *et al.*, 2003). Dans des interactions compatibles et incompatibles entre le colza, *Brassica napus*, et *Peronospora parasitica*, trois oxylipines ont été détectées. Deux de ces composés sont dérivés de la voie de la 9-LOX, alors que l'autre est un dérivé de la voie 13-LOX. Les trois oxylipines sont apparues 12 hpi à des concentrations élevées dans les interactions incompatibles. En revanche, elles ne sont détectées dans les interactions compatibles à 48 hpi à des concentrations inférieures à celles obtenues dans les plantes résistantes. Ces résultats suggèrent que ces oxylipines pourraient être impliquées dans la résistance de colza à *P. parasitica* (Walter *et al.*, 2006). Chez le peuplier, *Populus deltoides*, deux gènes LOX, *PdLOX1* et *PdLOX2*, ont été proposés comme candidat à rôle dans la résistance à *Marssonina brunnea f. sp. multigermtubi* quand leurs niveaux d'expression ont été augmentés après une exposition à ce champignon pathogène (Cheng *et al.*, 2006).

Dans notre étude, la résistance du cotonnier à la bactérie *Xcm*, gouvernée par la relation gène pour gène, est déterminée par 20 gènes de résistance (R) majeurs ou mineurs. Elle se caractérise par le déclenchement d'une RH, une forme de suicide programmé qui conduit à la mort cellulaire des tissus infectés. Cependant, les contournements de résistance au champ récemment observés en Afrique traduisent l'apparition de nouvelles races de *Xcm* et montrent les limites de l'amélioration variétale pour la résistance à *Xcm* en terme de durabilité de cette résistance. Une connaissance plus approfondie des mécanismes qui gouvernent la mise en place de la RH s'avère donc nécessaire pour gérer au mieux la durabilité de cette résistance.

Un certain nombre de résultats ont été acquis chez le génotype RébaB50, porteur des gènes  $R_{B_2B_3}$  dont les produits interagissent spécifiquement avec ceux des gènes *avr* de la race 18 de *Xcm* pour conduire à la RH. Dans la cascade de réactions mise en place, une peroxydation des lipides – acides gras polyinsaturés - a été identifiée, corrélée à une activité 9S-LOX, 24hpi à la transcription du gène *GhLOX1*, la perte en eau des tissus et l'apparition du phénotype RH (Jalloul *et al.*, 2002). Durant la maladie causée chez ce cultivar par la race 20 virulente de *Xcm*, une peroxydation 9S-LOX-dépendante plus faible et plus tardive, 72hpi, a été observée, associée à la chlorose des tissus infectés, mais pas à la nécrose. A la lumière de la bibliographie et des travaux sur le cotonnier, il apparaît que la peroxydation des lipides membranaires est un mécanisme clé dans l'établissement de la résistance spécifique et pour mieux comprendre le rôle du métabolisme des oxylipines dans la mise en place de la RH. Au cours des travaux exposés dans ce chapitre, nous essayerons d'approcher le rôle de la lipoxygénase *GhLOX1* dans l'interaction du cotonnier avec la bactérie *Xcm*. Nous nous sommes attachés à démontrer que l'activité du gène *GhLOX1* n'est pas uniquement liée à l'interaction entre le génotype Réba B50 du cotonnier et la race 18 de *Xcm*. Six génotypes de *G. hirsutum* contenant les gènes  $B_2B_3$ ,  $B_2$ ,  $b_6$ ,  $B_2B_6$ ,  $B_{12}$  ainsi que Acala 44, une variété ne contenant aucun gène R, ont été inoculés par l'une des races 18, 20 ou 1 de *Xcm* sont exposés. Plusieurs combinaisons d'interactions gène R – gène *avr* ont ainsi été testées durant lesquelles le phénotype de la résistance, l'activité enzymatique totale LOX et la transcription du gène *GhLOX1* ont été suivis. Les résultats obtenus suggèrent une variabilité de la RH en fonction des sources de résistances utilisées et une corrélation entre l'apparition du phénotype RH, l'activité enzymatique et la transcription du gène *GhLOX1*. Nos résultats montrent que cette relation peut dépendre du déterminisme génétique et confirment qu'au moins une LOX, *GhLOX1*, est impliquée dans la résistance spécifique du cotonnier à *Xcm*. Le gène *GhLOX1* peut donc être considéré comme un marqueur moléculaire facile à appréhender de cette résistance.

## RESUME

Chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.), l'interaction avec la bactérie pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* repose sur le concept gène-à-gène. L'infection du cultivar Réba B50 par la race 18 de Xcm conduit à une HR ; la race 20, en revanche, provoque la maladie et à terme la mort de la plante. Des travaux antérieurs ont montré que la mort cellulaire hypersensible était associée à une activité 9S-lipoxygénase responsable de la peroxydation des lipides et à la transcription du gène *GbLOX1*. Dans cet article, la question de savoir si la réponse LOX était liée à la résistance du cotonnier à la bactériose. Différentes combinaisons gène R – gène *avr* ont ainsi été testées au cours desquelles le phénotype de l'interaction, la transcription du gène *GbLOX1* et la mesure de l'activité LOX ont été suivis. Les génotypes de cotonnier contenant les gènes de résistance  $B_2B_3$ ,  $B_2b_6$  ou  $B_{12}$  ainsi que des lignées quasi-isogéniques renfermant les single  $B_2$ , ou  $b_6$  ont été infectées par les races 1, 18 ou 20 de Xcm. Dans les interactions incompatibles étudiées, la réponse LOX est concomitante à l'apparition du phénotype HR, renforçant l'hypothèse selon laquelle la peroxydation des lipides est un mécanisme clé de la mort cellulaire hypersensible.

UMR RPB « Résistance des Plantes aux Bioagresseurs » (IRD, CIRAD, UMII), IRD, Montpellier, France

## Association of Lipoxygenase Response with Resistance of Various Cotton Genotypes to the Bacterial Blight Disease

M. SAYEGH-ALHAMDIA<sup>1</sup>, P. MARMEY<sup>1</sup>, A. JALLOUL<sup>2</sup>, A. CHAMPION<sup>1</sup>, A. S. PETITOT<sup>1</sup>, A. CLERIVET<sup>1</sup> and M. NICOLE<sup>1</sup>

Authors' addresses: <sup>1</sup>IRD, UMR RPB « Résistance des Plantes aux Bioagresseurs » (IRD, CIRAD, Université Montpellier II), BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France; <sup>2</sup>Faculty of Agronomy, Department of Plant Protection, University of Damascus, Syria (correspondence to M. Nicole. E-mail: nicole@mpl.ird.fr)

Received October 12, 2007; accepted December 22, 2007

**Keywords:** lipoxygenase, *Xanthomonas*, *Gossypium hirsutum*, bacterial blight, hypersensitive reaction

### Abstract

In cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.), the interaction with the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*) is governed by the gene-for-gene concept. The interaction between the cultivar Réba B50 and the race 18 of *Xcm* leads to an hypersensitive reaction (HR); this cultivar is, however, susceptible to the race 20, with the death of the plant as a consequence. Previous work showed that the induced HR was correlated with 9S-lipoxygenase (LOX) activity responsible for lipid peroxidation. A LOX gene (*GhLOX1*) whose activity is involved in cell death during HR was characterized. In this study, we investigated whether the lipoxygenase response could be related to cotton resistance in different cotton *Xcm* combinations. Various combinations of R – *avr* genes were selected to assess whether the *GhLOX1* gene transcription and LOX activity could be correlated with the resistance phenotype. Cotton genotypes with the *B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>*, *B<sub>2</sub>b<sub>6</sub>* or *B<sub>12</sub>* genes, or cotton near-isogenic lines containing single *B* genes (*B<sub>2</sub>*, *b<sub>6</sub>*) were infected by race 1, 18 or 20 of *Xcm*. Phenotypes were analysed for all interactions tested. For incompatible interactions, the LOX response appears to be concomitantly triggered during cotton resistance strengthening the previous evidence that this reaction is a key event of hypersensitive cell death.

### Introduction

A major source of resistance in plants is conditioned by the interaction between products of plant resistance and pathogen avirulence genes. This gene for gene defence strategy (Flor, 1971) is characterized by the activation of the hypersensitive reaction (HR) at sites of infection where the tissue collapse leads to dry lesions and rapid host cell death and to pathogen growth restriction (Pontier et al., 1998). Conversely, in compatible interactions, the recognition step is either lacking or not sufficient resulting in weak plant reactions allowing pathogen to spread.

Resistance of tetraploid cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) interacting with *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. Smith) Dye (*Xcm*) responsible for bacterial blight is conferred by one or several of the 18 resistance genes (R) identified so far (De Feyter et al., 1993; Delannoy et al., 2005; Gabriel et al., 1986; Essenberg et al., 2002; De Feyter et al., 1998). The cultivar Réba B50 that contains *B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>* R genes displays an HR when exposed to the incompatible race 18 of *Xcm* (Nicole et al., 1998). Among the defence responses that were characterized during the cotton HR, including the oxidative burst (Martinez et al., 1998; Voloudakis et al., 2006), accumulation of salicylic acid (Martinez et al., 2000), transcription of peroxidase genes (Delannoy et al., 2003) and synthesis of antimicrobial molecules (Dai et al., 1996; Essenberg et al., 1990), the peroxidation of membrane lipids performed by lipoxygenases (LOXs; linoleate: oxygen oxidoreductase, EC1.13.11.12) was of crucial importance (Jalloul et al., 2002).

In many plant species, LOXs were reported to contribute to the defence against pathogenic micro-organisms (Farmer, 1994; Feussner and Wasternack, 2002). LOX activity was shown to increase in parallel with the induction of the HR symptoms, whereas LOX activity peaking was delayed and reached much lower levels in compatible interactions (Montillet et al., 2002).

In the case of Réba B50 cotyledons infected with the incompatible race *Xcm* 18, with an HR observed, LOX enzymatic activity was detected at 20 h postinoculation (hpi), and it coincided with massive production of 9S fatty acid hydroperoxides, drastic water loss of reacting cells, and the appearance of HR lesions at the leaf surface (Jalloul et al., 2002). LOX activity was preceded by the accumulation of transcripts of a gene, *GhLOX1*, whose full length sequence analysis revealed that it encoded a putative 9-LOX (Marmey et al., 2007). In the compatible interaction

of Réba B50 with *Xcm* race 20, LOX activity was weak, occurred late, and did not correlate with water loss, but was concomitant with leaf chlorosis (Jalloul et al., 2002). Taken together, these observations reinforced the hypothesis that LOX-dependent lipid peroxidation plays an important role in the HR execution.

In this study, we investigated whether the LOX enzymatic and transcriptional response could be related to cotton resistance regardless of the resistant genetic background. Different combinations of R – *avr* genes interactions were used, and phenotypes, LOX activity and *GhLOX1* transcription were analysed. Cotton genotypes containing two different combinations of R genes, namely  $B_2B_3$ , or  $B_2b_6$ , and single R genes  $B_2$ ,  $b_6$ , or  $B_{12}$ , three of the most important genes that confer resistance to *Xcm* were infected by *Xcm* race 1, 18 or 20. *Xcm* race 20 is known to be virulent for all cotton genotypes, whereas both race 1 and race 18 induced a more or less dramatic HR (Delannoy et al., 2005; Hillocks, 1992). We found that in all incompatible interactions tested, the LOX enzymatic and transcriptional response was concomitantly triggered during cotton resistance strengthening previous evidence that this reaction is a key event in the establishment of the hypersensitive cell death.

## Materials and Methods

### Bacterial strains

*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*) races 1, 18 and 20 were maintained at 30°C on 0.5% w/v yeast extract, 0.5% w/v bacteriological peptone, 0.5% w/v glucose as a carbon source, solidified with 1.5% w/v agar (YPG agar; Difco, Detroit, MI, USA) in distilled water. Bacteria for inoculation were grown in 150 ml YPG medium in a shaking incubator at 150 rpm, 30°C. After 18 h growth, cultures were washed once with sterile water by centrifugation at 10 000 g for 10 min to remove nutrients and exopolysaccharides, then the bacterial pellet was resuspended in sterile water and adjusted to 10<sup>8</sup> cfu /ml.

### Genotypes of cotton plants

Six genotypes of *G. hirsutum* were used in this study. Acala 44 was a genotype previously described (Brinkerhoff, 1970) as containing no resistance (R) gene. Acala 44E was a single plant obtained from the original Acala 44 parent and used as recurrent parent in backcrosses to obtain near isogenic lines (NILs) (Essenberg et al., 2002). Acala 44E was used as a control in our study. Acala B<sub>2</sub> (*AcB*<sub>2</sub>) was a NIL containing the  $B_2$  R gene (Essenberg et al., 2002), Acala  $b_6$  (*Ac* $b_6$ ) was a NILs containing the  $b_6$  R gene (Essenberg, personal communication) and S295 contained the  $B_{12}$  R gene (Girardot et al., 1986). Empire  $B_2b_6$  (*Emp* $B_2b_6$ ) was a putative NIL containing  $B_2$  and  $b_6$  genes in the Empire 8-0-8 genotype (Wright et al., 1998). The cultivar Réba B50 (Allenx Stoneville 2B), similar to the 101-102B line contained  $B_2B_3$  R genes (Innes, 1983; Hillocks, 1992) and was named Réba $B_2B_3$ .

### Growth and inoculation of cotton plants

The seeds of these genotypes were cultivated in a greenhouse under natural light and a 30/25°C light/dark cycle with relative humidity averaging to 80%. These conditions were shown to favour the bacterial development.

*Xcm* races 1, 18 or 20 were used for inoculations. Bacterial suspensions or sterile water as control were injected at the lower surface of 10 -day-old cotyledons using a needleless syringe. Combinations of interactions R-*avr* genes were observed phenotypically for a period of 240 h hpi. Cotton cotyledons were harvested at 0, 4, 9, 24, 48 and 144 hpi to be biochemically and molecularly analysed.

### Water content estimation of cotyledons

Cotyledons were harvested at 0, 4, 9, 24, 48, 144 and 192 hpi, and weighed ( $W1$ : weight before dessication). They were then placed into an oven at 70°C for 24 h and weighed again ( $W2$ : weight after dessication). The percentage of water loss of cotyledons was obtained according to the following formula:

$$\frac{W1 - W2}{W1} \times 100$$

### LOX activity in cotyledon extracts

To assess LOX activity in cotton cotyledons, extracts were prepared according to the procedure described (Rusterucci et al., 1999) on 1 g of frozen cotyledon tissues. The extract (0.5 ml) was incubated for 20 min at 25°C with 1 ml of 250 mM sodium phosphate buffer (pH 7) and 5  $\mu$ l of an ethanolic solution of the LOX substrate linoleic acid (100 mM). The LOX reaction was stopped by addition of 70  $\mu$ l of HClO<sub>4</sub> (12 N), and hydroperoxy fatty acids were extracted with 2 ml hexane. After vigorous shaking, the absorbance at 234 nm of the upper organic phase was measured using a spectrophotometer (Uvikon 922; Kontron, Marseille, France) against a blank containing hexane. LOX activity was expressed in pkat/mg protein using a molar extinction coefficient for conjugated dienes of 25 000 M/cm.

### RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted from bacteria- or water-infiltrated cotyledons using the plant Rneasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The reverse transcription (RT) reactions were performed using the Omniscript RT Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed in a 50  $\mu$ l volume containing DAP Goldstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium), 20 pmol of each primer and 20 ng of each RT reaction. Primers used for RT-PCR were specific for *GhLOX1* (Marmey et al., 2007) and were named LOX1-F417 (5'-GGAGGAAATCGGATTAC-CCGG-3') and LOX1-RV1215 (5'-GGCAAACCTTCATCAGTCC-3'). Reactions were run in an MJR thermocycler (MJR, Watertown, MA, USA) with a



denaturation step of 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min, with a final extension at 72°C, 10 min. PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gels in tris-acetate-ethylenediaminetetraacetate buffer, then visualized under UV light. In some cases, PCR amplification products were gel purified using standard procedure (Qiagen) and sequenced (Genome Express, Meylan, France).

## Results

### Symptoms of inoculated plants

The six genotypes (*RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>*, *AcB<sub>2</sub>*, *Acb<sub>6</sub>*, *S295B<sub>12</sub>*, *EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>*, *Acala 44E*) were inoculated with races *Xcm* 1, 18 or 20 and infiltrated with water as control. Symptoms were observed over a period of 10 days (Fig. 1). Necrosis, chlorosis and dried lesions were noted.

The following interactions tested exhibited HR symptoms (Table 1): *RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/Xcm* 1, *RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/Xcm* 18, *AcB<sub>2</sub>/Xcm* 1, *Acb<sub>6</sub>/Xcm* 1, *EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>/Xcm* 1, *EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>/Xcm* 18, *S295B<sub>12</sub>/Xcm* 1, *S295B<sub>12</sub>/Xcm* 18. It is noteworthy that two types of HR symptoms were observed (Fig. 2). Type 1 HR corresponded to dry lesions associated with necrosis and bleaching of tissues and was observed on genotypes *RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>*, *EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>* and *S295B<sub>12</sub>* (Fig. 2a). Type 2 showed dry lesions surrounded by milder symptoms and was only observed on genotypes *AcB<sub>2</sub>* and *Acb<sub>6</sub>* (Fig. 2b). Time of appearance of symptoms differed regarding the tested interaction. Dry lesions appeared 48 hpi for *RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/Xcm* 1, *RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/Xcm* 18 and *S295B<sub>12</sub>/Xcm* 1, 72 hpi for *S295B<sub>12</sub>/Xcm* 18, 144 hpi for *EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>/Xcm* 1, 240 hpi for *AcB<sub>2</sub>/Xcm* 1, *Acb<sub>6</sub>/Xcm* 1 and *EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>/Xcm* 18. Genotype *AcB<sub>2</sub>* and *Acb<sub>6</sub>* inoculated with *Xcm* 18 led to

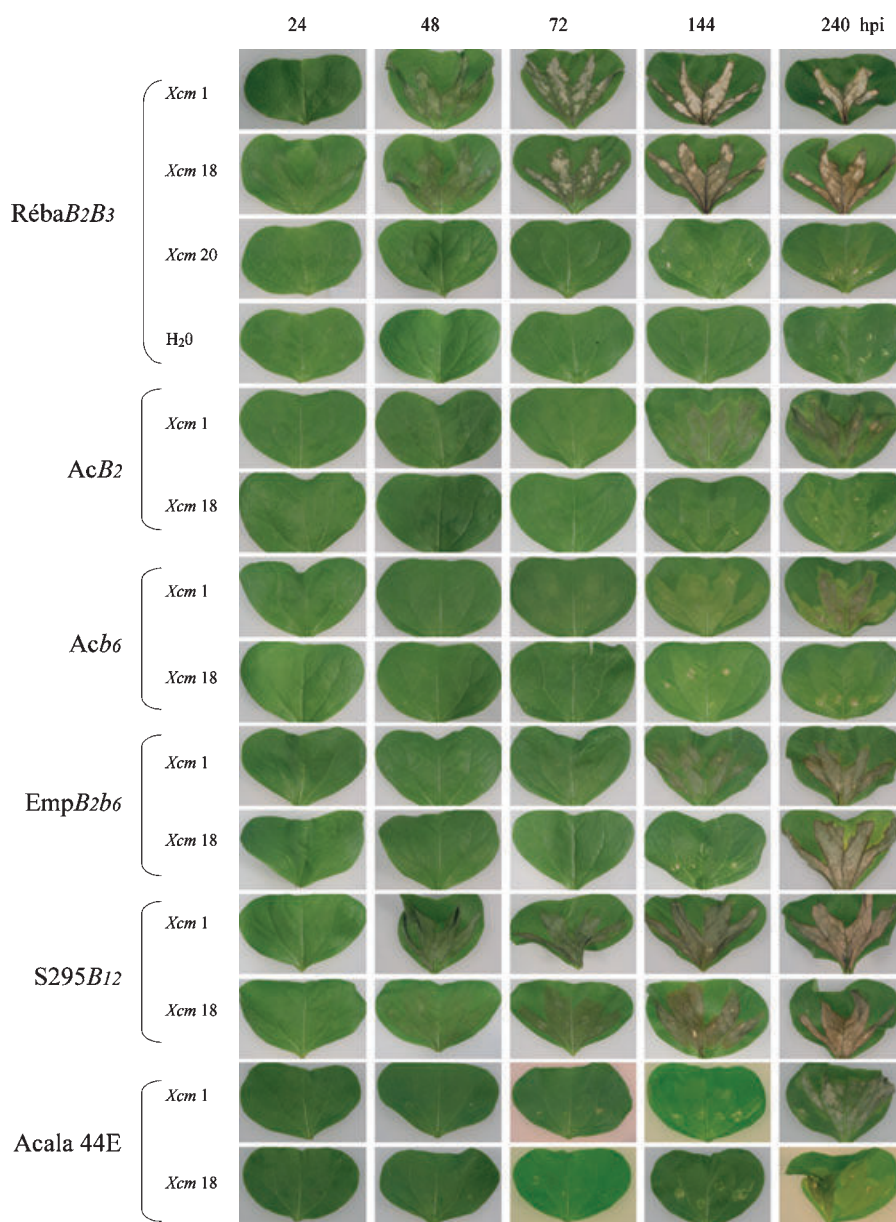


Fig. 1 Macroscopic aspects of hypersensitive reaction lesions and disease symptoms over a period of 240 h post-treatment for the different interactions tested

Table 1  
Observed type of symptoms for the different interactions tested

		<i>Xcm</i> 1	<i>Xcm</i> 18	<i>Xcm</i> 20
RébaB <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	Phenotype observed	HR	HR	S
	Type of symptoms	1	1	
AcB <sub>2</sub>	Phenotype observed	HR	undetermined	S
	Type of symptoms	2		
Acb <sub>6</sub>	Phenotype observed	HR	undetermined	S
	Type of symptoms	2		
EmpB <sub>2</sub> b <sub>6</sub>	Phenotype observed	HR	HR	S
	Type of symptoms	1	1	
S295B <sub>12</sub>	Phenotype observed	HR	HR	S
	Type of symptoms	1	1	
Acala 44E	Phenotype observed	S	S	S
	Type of symptoms			

HR, hypersensitive reaction; S, sensitive; undetermined.

Two types of HR symptoms were observed. Type 1 corresponded to dry lesions associated with necrosis and bleaching of tissues and brown pigmentation in the veins, while Type 2 showed dry lesions surrounded by milder symptoms.

an undetermined phenotype. No disease symptoms were visible on first leaves when HR type 1 or type 2 was observed on cotyledons, confirming that both types of symptoms were related to the HR.

Genotypes AcB<sub>2</sub>, Acb<sub>6</sub> and S295B<sub>12</sub> inoculated with *Xcm* 20 showed leaf chlorosis at 240 hpi (data not shown) similar to the one observed for RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>. The genotype Acala 44E used as a control did not contain known R genes and so far, no HR symptoms were observed whatever the *Xcm* race inoculated. It displayed chlorosis typical of disease symptoms. No HR symptoms were observed in any of the genotypes infiltrated with water.

#### Water contents in cotyledons

Experimental procedure was conducted to estimate variation in the water content of *Xcm*-inoculated cotyledons; water-infiltrated cotyledons were used as controls (Fig. 3). Genotypes RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>, EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub> and S295B<sub>12</sub> showed significant differences in water loss for both *Xcm* 1- and *Xcm* 18-inoculated cotyledons compared with controls. AcB<sub>2</sub> and Acb<sub>6</sub> showed significant differences only for *Xcm* 18-inoculated cotyledons. The water content of Acala 44E/*Xcm* inoculated cotyledons was similar to the control whatever the *Xcm* inoculated.

#### Lipoxygenase activities detected in cotyledons

Total LOX activity was followed in cotyledons for the different interactions from 0 to 144 hpi (Fig. 4). Analy-

sis was stopped at 48 hpi on genotypes RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub> and S295B<sub>12</sub> as tissues were too dry to assess for LOX activity.

LOX activity remained very low in water-infiltrated cotyledons for all genotypes. LOX activity in plant interacting with *Xcm* 20 was similar to the water-infiltrated ones for genotypes Acala 44E, AcB<sub>2</sub>, Acb<sub>6</sub> and EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub> but slightly increased for genotypes RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub> and S295B<sub>12</sub>.

For interactions of *Xcm* 1 or *Xcm* 18 with genotypes containing R genes, LOX activities were always significantly above the corresponding controls (with *Xcm* 20 or water-treatment) and could be classified into three groups. At first, LOX activities increased progressively over the time course for the interactions Acb<sub>6</sub>/*Xcm* 18, EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>/*Xcm* 1 and EmpB<sub>2</sub>b<sub>6</sub>/*Xcm* 18 with activities at 48 and 144 hpi of 14.2 and 29.5 pkat per mg protein 4.2 and 45.4 pkat per mg for 32.1 and 71.5 pkat per mg respectively. Secondly, after 24–48 hpi, LOX activities remained constant or slightly decreased till 144 hpi for the interactions AcB<sub>2</sub>/*Xcm* 1 and AcB<sub>2</sub>/*Xcm* 18 and Acb<sub>6</sub>/*Xcm* 1, with activities at 48 and 144 hpi of 50.2 and 24.5, 46.0 and 35.1, 83.9 and 90.0 pkat per mg protein, respectively. Lastly, LOX activities rose rapidly in the first 24 hpi, but could not be followed up after 48 hpi due to damaged tissues with activities at 24 and 48 hpi of 71.0 and 87.8 pkat per mg protein for RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/*Xcm* 1, 113.9 and 61.4 pkat per mg protein for RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/*Xcm* 18, 48.6 and 58.6 pkat per mg protein for S295B<sub>12</sub>/*Xcm* 1 and 63.6 and 51.7 pkat per mg protein for S295B<sub>12</sub>/*Xcm* 18, respectively.

Acala 44E showed no LOX activities whatever the treatment, with the exception of a slight increase when interacting with *Xcm* 1.

#### Analysis of *GhLOX1* transcription during interactions

Transcription activity of the *GhLOX1* gene was analysed for all different tested interactions at five time-points: 4, 9, 24, 48 and 144 hpi (Fig. 5). The later point was absent from the analysis for genotypes RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub> and S295B<sub>12</sub> with *Xcm* 1 and *Xcm* 18, as tissues were too dry to perform RNA extraction. RT-PCR experiments were performed using *GhLOX1* specific primers. The expression of cotton actin gene served as an experimental control, showing similar expression levels during all the sampling time points for the different tested interactions (data not shown).

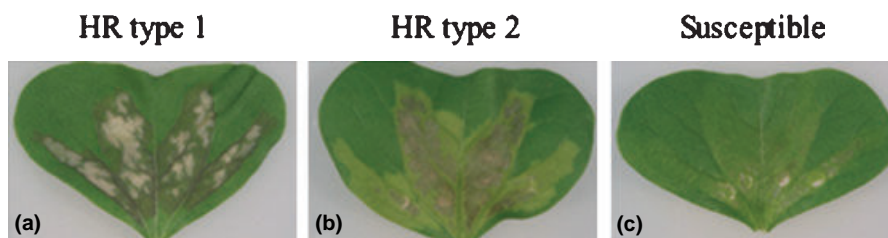


Fig. 2 Types of hypersensitive reaction lesions observed. (a) and (b) show symptoms of interactions RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/*Xcm* 18 at 72 hpi and Acb<sub>6</sub>/*Xcm* 1 at 240 hpi, respectively, (c) shows symptoms of susceptible phenotype, with RébaB<sub>2</sub>B<sub>3</sub>/*Xcm* 20 interaction at 240 hpi

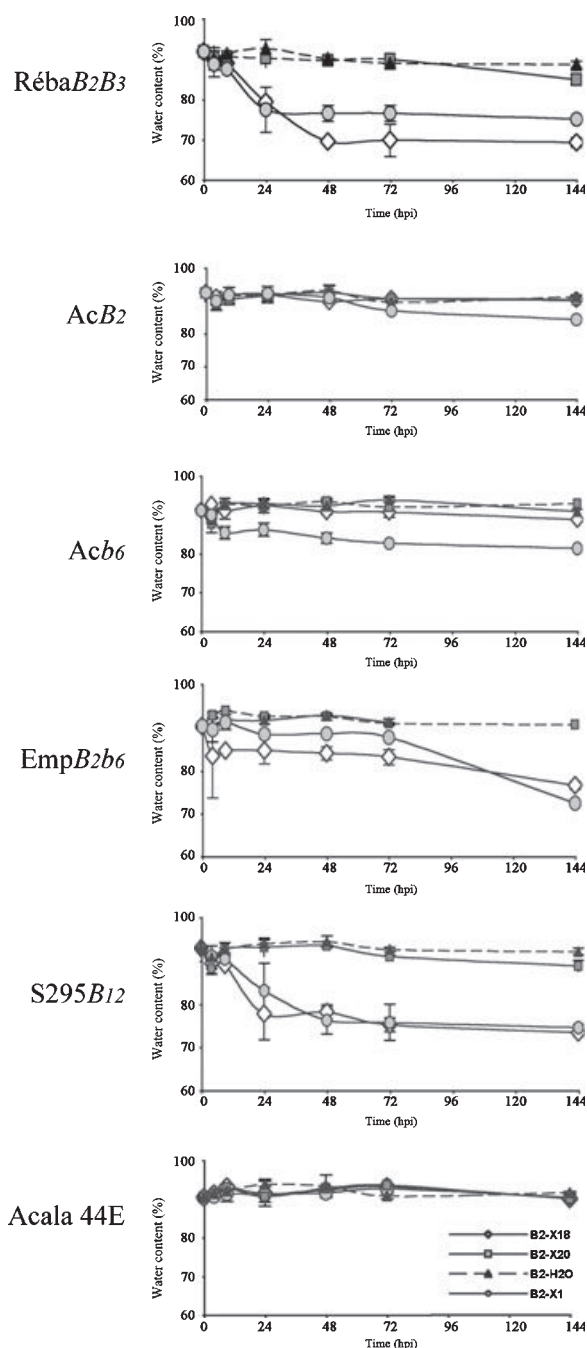


Fig. 3 Water loss in *Xcm* 1-, *Xcm* 18-, *Xcm* 20- and water-infiltrated cotyledons of the different genotypes analysed Réba $B_2B_3$ , Ac $B_2$ , Ac $b_6$ , Emp $B_2b_6$ , S295 $B_{12}$  and Acala 44E. Time course ranged from 4 to 144 h post-treatment

The low constitutive expression of *GhLOX1* was represented by a faint band observed for some interactions at all points. However, in some cases, the PCR products were not abundant enough to be detected on UV light with the PCR conditions used, and no band could be detected. These two situations (presence of faint band or no band) showed no specific expression of *GhLOX1*. That was the case of several interactions such as Ac $B_2B_3$ /*Xcm*20, Ac $B_2B_3$ /H $_2$ O, Ac $B_2$ /*Xcm* 20, Ac $B_2$ /H $_2$ O, S295 $B_{12}$ /*Xcm* 20, S295 $B_{12}$ /H $_2$ O, Ac $b_6$ /*Xcm* 18, Ac $b_6$ /*Xcm* 1, Ac $b_6$ /*Xcm* 20, Ac $b_6$ /H $_2$ O,

Emp $B_2b_6$ /*Xcm* 20, Emp $B_2b_6$ /H $_2$ O, Acala44E/*Xcm* 18, Acala44E/*Xcm* 1, Acala44E/*Xcm* 20 and Acala44E/H $_2$ O. A higher accumulation of *GhLOX1* transcripts were noted for interactions Réba $B_2B_3$ /*Xcm* 18, Réba $B_2B_3$ /*Xcm* 1, Ac $B_2$ /*Xcm* 18, Ac $B_2$ /*Xcm* 1, S295 $B_{12}$ /*Xcm* 18, S295 $B_{12}$ /*Xcm* 1, Emp $B_2b_6$ /*Xcm* 18 and Emp $B_2b_6$ /*Xcm* 1, displaying a specific expression of *GhLOX1*.

## Discussion

Interactions between *G. hirsutum* and the bacterial pathogen *X. campestris* pv. *malvacearum* are understood in the context of the gene-for-gene concept. The latter predicts that pathogen virulence and plant resistance result if the pathogen *avr* gene product and the corresponding plant R gene product interact either directly or indirectly (Dangl and Jones, 2001).

Several major R genes or polygene complexes (*B* genes) conferring cotton resistance to the bacterial blight disease were identified and reviewed (Hillocks, 1992). Some of them were used in an established panel of differential cotton hosts to test *Xcm* strains, leading to the identification of 22 races (Follin, 1983; Follin et al., 1988; Brinkerhoff, 1970; Hunter et al., 1968; Delannoy et al., 2005). Improvement in cotton resistance in the field against multiple races of *Xcm* was obtained by pyramiding *B* R genes in cotton lines (Bird, 1982; Brinkerhoff et al., 1984; Bayles et al., 2003) and by the development of a set of NILs to obtain homozygous lines for a single *B* R gene (Essenberg et al., 2002; Wright et al., 1998). Our present analysis involved the combination of six cotton genotypes and three *Xcm* races (1, 18, 20), thus eighteen possible interactions. The Acala 44E genotype did not contain *B* R genes and was expected to be susceptible to all known *Xcm* races. Réba $B_2B_3$  combined  $B_2$  and  $B_3$  R genes, which confer resistance to a large number of *Xcm* races. Resistance in Ac $B_2$ , Ac $b_6$ , S295 $B_{12}$  and Emp $B_2b_6$  NILs to *Xcm* 1, *Xcm* 18 and 20 needed to be tested.

Analysis of the interaction phenotype was conducted over a period of 240 hpi. No HR symptoms were observed on interactions with the genotype Acala 44E, whatever the inoculated races, consistent with this line's lack of R genes. However, the genotype Réba $B_2B_3$  showed strong HR symptoms, starting at 48 hpi for *Xcm* 1 and *Xcm* 18 inoculated plants, but no HR symptoms for *Xcm* 20 treated ones. These observations were in accordance with what was known on pyramiding the  $B_2$  R gene with the  $B_3$  R gene that brought resistance to all races but *Xcm* 20, 21, 22 (Delannoy et al., 2005). Presence of a *B* R gene in NILs brought up HR symptoms for all plants inoculated with *Xcm* 1, but only for S295 $B_{12}$  and Emp $B_2b_6$  with *Xcm* 18. Interactions Ac $b_6$ /*Xcm* 18 and Ac $B_2$ /*Xcm* 18 did not lead to HR symptoms.

In the widely studied model of interaction Réba $B_2B_3$ /*Xcm* 18, HR symptoms as dry lesions exhibiting cells with condensed cytoplasm were correlated with typical tissue dehydration (Jalloul et al., 2002). Our analysis showed that water loss of tissues



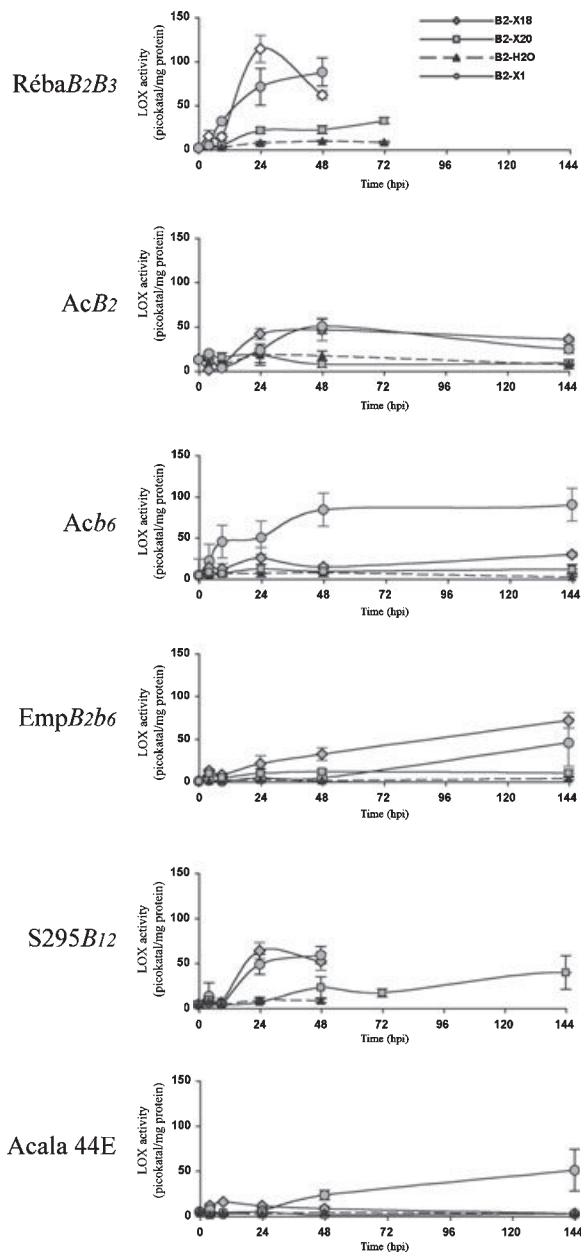


Fig. 4 Time course of 9S-lipoxygenase (LOX) activity in *Xcm* 1-, *Xcm* 18-, *Xcm* 20- and water-infiltrated cotyledons of the different genotypes analysed Réba $B_2B_3$ , Ac $B_2$ , Ac $b_6$ , Emp $B_2b_6$ , S295 $B_{12}$  and Acala 44E. LOX activity was measured using linoleic acid (18 : 2) as substrate according to the UV method found in Material and Methods section. Time course ranged from 4 to 144 h post-treatment

was observed for all interactions developing HR symptoms, and was more extensive with type 1 HR symptoms (i.e. with genotypes Réba $B_2B_3$ , S295 $B_{12}$  and Emp $B_2b_6$  combined with *Xcm* 1 and *Xcm* 18).

Tissue dehydration was the result of plasma membrane degradation due to massive production of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides. Correlation between lipid peroxidation and hypersensitive cell death was demonstrated by the establishment of a LOX-mediated production of 9 *S*-hydroxy fatty acids (Jalloul et al., 2002, Montillet et al., 2002). During the interactions selected in the present analysis, total LOX

activity measured over a period of 144 hpi when permitted (when tissues were not too dry) revealed that kinetics of LOX activities were quite different depending on the interaction. However, within any given cotton line, it appeared that LOX activity was stronger when plants displayed HR symptoms, compared with that detected during disease. Differences were quite significant at 24 hpi when early symptoms of HR were observed (i.e. Réba $B_2B_3$ /*Xcm* 1, Réba $B_2B_3$ /*Xcm* 18, S295 $B_{12}$ /*Xcm* 1 and S295 $B_{12}$ /*Xcm* 18), and at 144 hpi for interactions developing late symptoms (i.e. Ac $B_2$ /*Xcm* 1, Ac $B_2$ /*Xcm* 18, Ac $b_6$ /*Xcm* 1, Ac $b_6$ /*Xcm* 18, Emp $B_2b_6$ /*Xcm* 1 and Emp $B_2b_6$ /*Xcm* 18).

When the cv Réba $B_2B_3$  was challenged with *Xcm* 18, *GhLOX1* (a gene coding for a putative 9-LOX) was cloned and found to be highly expressed, suggesting that *GhLOX1* was associated with the HR (Marmey et al., 2007). Similarly, a higher accumulation of *GhLOX1* transcripts were observed for interactions that developed HR symptoms, with the exception of the interaction Ac $b_6$ /*Xcm* 1 where transcripts levels did not appear significantly more abundant compared with Ac $b_6$ /*Xcm* 18 or Ac $b_6$ /*Xcm* 20. Isolation and sequencing of the RT-PCR products were performed in all cases displaying sequences of amplified products 100% identical to *GhLOX1* sequence (data not shown).

This study showed that the LOX enzymatic and transcriptional response is associated with resistance of various cotton genotypes to the bacterial blight caused by *Xcm* race 1 and race 18. LOX activity, *GhLOX1* gene expression and the resulting water loss of HR cells generally paralleled the HR phenotype, although diversity in the responses was observed in the phenotype exhibited, and at biochemical and molecular levels. Plants tested contained different genes of resistance and behaved differently when challenged by *Xcm* races. Analysis regarding  $B_2$ ,  $b_6$  and  $B_2b_6$  R genes indicated a stronger HR phenotype when both  $B_2$  and  $b_6$  R genes were present in the same line (Emp $B_2b_6$ ). But this 'additional' effect was not verified for LOX activity and *GhLOX1* transcription, suggesting that the biological role of LOX-dependent lipid peroxidation was of qualitative importance for the bacterial-induced HR cell death. As little is known about activities of LOX protein and *LOX* genes *in planta* regarding the intensity and cellular location, their physiological significance could be estimated through the analysis of their activities *in vitro* only. Differences in the status of the  $B$  R genes (dominant or recessive) and the genetic background may explain variations observed in the LOX enzymatic and transcriptional response. Single  $B_2$  and  $b_6$  R genes were dominant and recessive, respectively, in NILs with an Acala 44E genetic background (Essenberg et al., 2002), and type 2 HR symptoms were observed when HR occurred. With these R genes cumulated in a NIL with an Empire genetic background, the  $b_6$  R gene appeared to be recessive (Wright et al., 1998), but increased resistance to *Xcm* race 1 and race 18, with symptoms of type 1 observed when HR occurred. This was in accordance with the

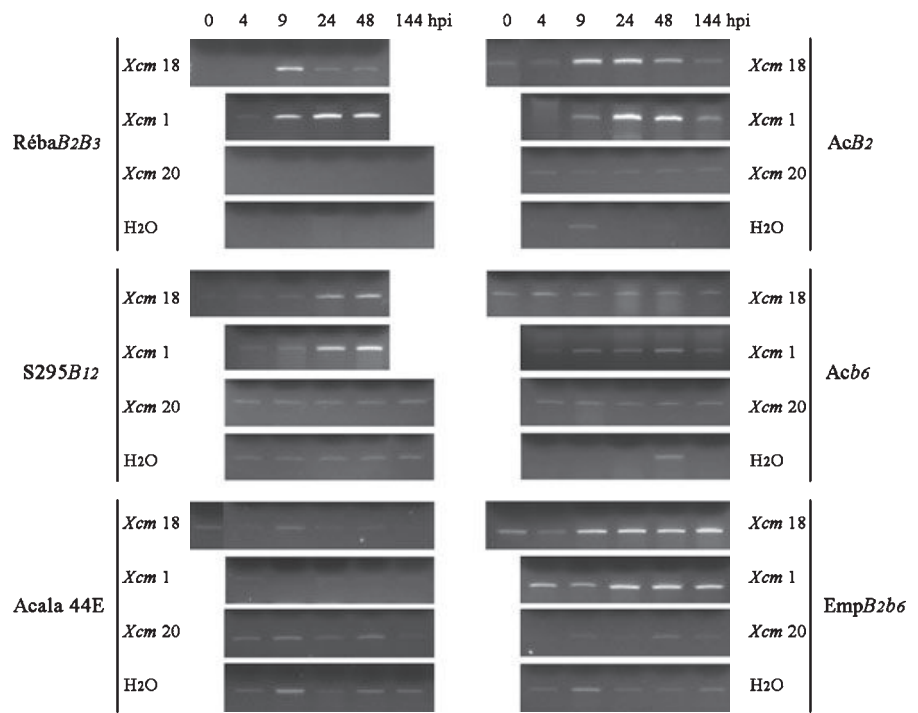


Fig. 5 Reverse transcription-PCR analysis of cotton *GhLOX1* gene in *Xcm* 1-, *Xcm* 18-, *Xcm* 20- and water-infiltrated cotyledons of the different genotypes. Réba $B_2B_3$ , Ac $B_2$ , S295 $B_{12}$ , Ac $b_6$ , Acala 44E and Emp $B_2b_6$ . cDNAs were generated from 4 to 144 h post-treatment

observation that the  $b_6$  locus modified the expression of the  $B_2$  locus (Knight, 1953); more recent findings did not confirm this conclusion when cotton resistance was tested against *Xcm* race 2 and race 4 (Wright et al., 1998), suggesting that the  $b_6$  locus may be involved in a horizontal component of resistance. High resistance of the genotype Réba $B_2B_3$  (exhibited by type 1 HR) could be explained by the capacity of the  $B_3$  allele to reduce the severity of disease caused by the pathogen when associated with the  $B_2$  locus (Wright et al., 1998). Unfortunately, we could not study the effect on the resistance phenotype of a NIL containing single  $B_3$  as a R gene challenged with *Xcm* 1 or *Xcm* 18, as such a NIL was not available.

In conclusion, our study confirmed that LOXs are involved in specific resistance of cotton to the bacterial blight caused by *Xcm*. The degree of rapidity and intensity of the LOX enzymatic and/or transcriptional response may depend on the nature of the  $B$  R gene, demonstrating the complexity of cotton resistance to *Xcm*. Furthermore, analysis of the *GhLOX1* transcription revealed that this LOX response is most likely 9-LOX specific, with *GhLOX1* being a key gene in this pathway. It appeared that the LOX response, as investigated here, could be a valuable tool to evaluate physiological variation in cotton resistance in geographical areas (i.e. Africa) where R genes are known to be overcome by virulent races of *Xcm*. This would be of importance if the hypothesis of the African origin of *Xcm* is confirmed.

#### Acknowledgements

We thank J. Aribi for technical assistance in the greenhouse work. We thank M. Essenberg for the gift of seed of cotton genotypes Acala 44E, Acala  $B_2$  and Acala  $b_6$ , and for critical reading of the manuscript.

#### References

- Bayles MB, Essenberg M, Pierce ML, Verhalen L. (2003) A pyramiding of near-isogenic lines of cotton with 0, 1, 2 or 3 genes for bacterial blight resistance. *Phytopathology* **93**:S97.
- Bird L. (1982) The MAR (multi-adversity resistance) system for genetic improvement of cotton. *Plant Dis* **66**:172–176.
- Brinkerhoff L. (1970) Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its relation to control. *Annu Rev Phytopathol* **8**:85–110.
- Brinkerhoff L, Verhalen L, Johnson WM, Essenberg M, Richardson P. (1984) Development of immunity to bacterial blight of cotton and its implications for other diseases. *Plant Dis* **68**:168–173.
- Dai G, Nicole M, Martinez C, Bresson E, Daniel JF, Andary C, Geiger JP. (1996) Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Race 18) and cotton. *Physiol Mol Plant Pathol* **49**:285–306.
- Dangl JL, Jones JDG. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**:826–833.
- De Feyter R, Mc Fadden H, Dennis L. (1998) Five avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* cause genotype-specific cell death when expressed transiently in cotton. *Mol Plant Microbe Interact* **11**:1030–1038.
- De Feyter R, Yang Y, Gabriel DW. (1993) Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. *Mol Plant Microbe Interact* **6**:225–237.
- Delannoy E, Jalloul A, Assigbetse K, Marmey P, Geiger JP, Lherminier J, Daniel JF, Martinez C, Nicole M. (2003) Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Mol Plant Microbe Interact* **16**:1030–1038.
- Delannoy E, Lyon BR, Marmey P, Jalloul A, Daniel JF, Montillet JL, Essenberg M, Nicole M. (2005) Resistance of cotton toward *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **43**:63–82.
- Essenberg M, Bayles MB, Samad R, Hall J, Brinkerhoff L, Verhalen L. (2002) Four near-isogenic lines of cotton with different genes for bacterial blight resistance. *Phytopathology* **92**:1323–1328.
- Essenberg M, Grover PBJ, Cover E. (1990) Accumulation of antibacterial sesquiterpenoids in bacterially inoculated *Gossypium* leaves and cotyledons. *Phytochemistry* **29**:3107–3113.
- Farmer EE. (1994) Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol Biol* **26**:1423–1437.

- Feussner I, Wasternack C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**:275–297.
- Flor HH. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**:275–276.
- Follin J. (1983) Races of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye in western and central Africa. *Cotton Fibres Trop* **38**:277–280.
- Follin J, Girardot B, Mangano V, Benitez R. (1988) Nouveaux résultats sur le déterminisme génétique de la résistance foliaire totale du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) à la bactériose *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye, race 18 et 20. *Cotton Fibres Trop* **43**:167–175.
- Gabriel DW, Burges A, Lazo GR. (1986) Gene-for-gene interactions of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* with specific resistance genes in cotton. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:6415–6419.
- Girardot B, Hequet E, Yehouessi MT, Guibordeau P. (1986) Finding a variety of *Gossypium hirsutum* L. resistant to strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye virulent on associations of major genes ( $B_2B_3$  or  $B_{9L}-B_{10L}$ ). *Cotton Fibres Trop* **41**:67–69.
- Hillocks RJ. Bacterial Blight. In: Hillocks RJ (ed.), *Cotton Diseases*, Wallingford, UK, CAB International, 1992, pp. 39–85.
- Hunter R, Brinkerhoff L, Bird L. (1968) Development of a set of Upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology* **58**:830–832.
- Innes N. (1983) Bacterial Blight of cotton. *Biol Rev* **58**:157–176.
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetse K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylides C, Daniel JF, Marmey P, Geiger JP, Nicole M. (2002) Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J* **32**:1–12.
- Knight RL. (1953) The genetics of blackarm resistance. IX. The gene B6M from *Gossypium arboreum*. *J Genet* **51**:270–275.
- Marmey P, Jalloul A, Alhamedia M, Assigbetse K, Cacas JL, Voloudakis A, Champion A, Clerivet A, Montillet JL, Nicole M. (2007) The 9-lipoxygenase *GhLOX1* gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Plant Physiol Biochem* **45**:596–606.
- Martinez C, Baccou JC, Bresson E, Baissac Y, Daniel JF, Jalloul A, Montillet JL, Geiger JP, Assigbetse K, Nicole M. (2000) Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Plant Physiol* **122**:757–766.
- Martinez C, Montillet JL, Bresson E, Agnel JP, Daniel JF, Geiger JP, Nicole M. (1998) Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Mol Plant Microbe Interact* **11**:1038–1047.
- Montillet JL, Agnel JP, Ponchet M, Vaillau F, Roby D, Triantaphylides C. (2002) Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiol Biochem* **40**:633–639.
- Nicole M, Daniel JF, Bresson E, Martinez C, El-Bachir O, Lopez F, Assigbetse K, Fernandez D, Montillet JL, Geiger JP. (1998) The hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Rec Res Develop Microbiol* **2**:641–654.
- Pontier D, Balague C, Roby D. (1998) The hypersensitive response A programmed cell death associated with plant resistance. *CR Acad Sci III* **321**:721–734.
- Rusterucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylides C. (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**:36446–36455.
- Voloudakis A, Marmey P, Delannoy E, Jalloul A, Martinez C, Nicole M. (2006) Characterization of Superoxide Dismutase (SOD) genes of cotton during its interaction with *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **68**:119–127.
- Wright RJ, Thaxton PM, El-Zik KM, Paterson AH. (1998) D-subgenome bias of *Xcm* resistance genes in tetraploid *Gossypium* (cotton) suggests that polyploid formation has created novel avenues for evolution. *Genetics* **149**:1987–1996.

## CONCLUSION

L'objectif initial de cette première partie de mes travaux de thèse était de vérifier si la transcription du gène *GhLOX1* pouvait servir de marqueur de résistance du cotonnier à *Xcm*. Si sa place dans la séquence d'évènements liée à l'exécution de la mort cellulaire de type hypersensible a été démontrée chez le génotype Réba B50 porteur des gènes de résistance  $B_2B_3$ , aucun élément expérimental ne permettait de préciser si le gène *GhLOX1* était exprimé chez d'autres variétés de cotonnier déclenchant une HR à la bactériose. Bien que l'activité de lipoxigénases ait pu être caractérisée dans d'autres pathosystèmes (tabac, *Arabidopsis*...), il paraissait nécessaire de vérifier le caractère général de cette réponse au sein de plusieurs génotypes de cotonnier contenant des gènes de résistance différents.

Les résultats de mes travaux montrent en effet que l'activité du gène *GhLOX1* est détectée au niveau transcriptionnel associée une activité enzymatique dans les tous les cultivars présentant une HR à *Xcm*. Même si l'ensemble de la gamme d'hôte permettant d'affirmer le déterminisme génétique de la résistance (Follin, 1983 ; Follin *et al.*, 1988 ; Gabriel *et al.*, 1996) n'a pas été testé en raison de l'indisponibilité de certains de ses génotypes, nous pouvons fortement suggérer que l'activité du gène *GhLOX1* peut être considérée comme un marqueur de la résistance du cotonnier à la bactériose. L'utilisation de lignées quasi-isogéniques ne portant qu'un seul gène R (Essenberg *et al.*, 2002) conforte cette hypothèse, mais révèle par ailleurs la complexité du déterminisme génétique et de la nature de l'expression de la résistance, le cotonnier étant en effet une espèce allotétraploïde (Wright *et al.*, 1996).

D'un point de vue strictement physiologique, on peut s'interroger sur les mécanismes associés à, voire dépendant de, l'activité du gène *GhLOX1* et leur conservation au sein des autres génotypes de cotonnier. Il a en effet été démontrée que le fonctionnement des gènes *LOXs* était étroitement lié à celui des acyl hydrolases de lipides (LAH), ou patatines, présentant une activité galactolipase (Cacas *et al.*, 2005). Ces auteurs suggèrent que ces LAH fournissent les 9-*LOXs* en substrats issus de l'hydrolyse des galactolipides des enveloppes des chloroplastes. Chez le tabac trois des quatre gènes LAH sont induits suite à une infection par le VMT (Dhondt *et al.*, 2000). Les protéines recombinantes de deux d'entre-eux affichent à la fois une activité phospholipase et galactolipase (Heitz *et al.*, 2004). Une activité galactolipase a de même été révélée chez le gène *NiPat1-3* suite à un traitement à la cryptogéine et une inoculation par une souche avirulente de *Ralstonia solanacearum* (Cacas *et al.*, 2005). Ces données militent en faveur d'une coexpression des

gènes LOX et LAH dans le mécanisme de peroxydation des lipides et nous ont incité à rechercher si un tel mécanisme intervenait également chez le cotonnier durant le HR à *Xcm*.

Les travaux auxquels j'ai participé ont permis d'identifier et de cloner un gène de patatine *GbPat1* (Cacas *et al.*, 2008). Une étude biochimique et moléculaire a montré que l'expression de ce gène était stimulée pendant la réaction incompatible entre le cultivar Réba B50 du cotonnier et *Xcm* race 18. La transcription du gène *GbPat1* précède l'activité galactolipase correspondante et les symptômes de mort cellulaire des tissus infectés. L'analyse de la séquence protéique révèle également que les acides aminés du site catalytique et son organisation tridimensionnelle sont conservés parmi les protéines de type patatine chez les plantes. Sur la base de ces résultats nous proposons (1) que le gène *GbPat1*, participe à la mobilisation de acides gras polyinsaturés des membranes chloroplastiques utilisés par la 9S-LOX pour initier la peroxydation des lipides accompagnant la HR du cotonnier, et (2) que le point de départ du métabolisme des oxylipines qui requiert l'action combinée des LAH et des LOXs est conservée chez le cotonnier et le tabac.

Pour étayer cette hypothèse, il serait séduisant de conduire des expérimentations complémentaires :

- la première serait de vérifier si la transcription de *GbPat1* est également activée dans d'autres couples cotonnier-*Xcm* comme cela a été fait dans ce chapitre avec le gène *GbLOX1*.
- la seconde consisterait à produire la protéine recombinante GhPat1 et d'analyser la spécificité de son substrat.
- la troisième reposerait sur la suppression de l'expression des gènes *GbPat1* et *GbLOX1* en utilisant la technique d'extinction transitoire par RNAi.

L'ensemble de ces résultats potentiels devrait renforcer la place du couple patatine-lipoxygénase dans l'exécution de la mort cellulaire de type hypersensible.

La suite de mon travail de thèse est cependant restée centrée sur le gène *GbLOX1* pour lequel j'ai entrepris l'analyse fonctionnelle dont la démarche mise en œuvre fait l'objet du corps du chapitre suivant.



## CHAPÎTRE 2

CONTRIBUTION A L'ANALYSE FONCTIONNELLE D'UNE  
LIPOXYGENASE DE COTONNIER :

ROLE DU GENE *GhLOX 1* DANS LA RESISTANCE A  
*XANTHOMONAS CAMPESTRIS*  
*PV MALVACEARUM*

## I. INTRODUCTION

Les travaux antérieurs conduits au laboratoire sur les mécanismes de la RH du cotonnier en réponse à l'agent pathogène *Xcm* ont montré que la peroxydation des lipides membranaires des cellules de cotonnier résistants était associée à une activité 9S-LOX (Jalloul, 2002). Elle est précédée par la transcription du gène *GbLOX1* et coïncide avec la perte en eau des tissus et l'apparition des lésions nécrotiques (Jalloul *et al.*, 2002). L'analyse de la séquence de ce gène a suggéré que l'activité enzymatique de la protéine pour laquelle elle code pourrait être liée à une activité de type 9-LOX. La transcription du gène *GbLOX1* est inductible par des traitements à l'AJ, comme le laissait supposer la séquence de son promoteur (Marmey *et al.*, 2007). L'activité LOX et la transcription du gène *GbLOX1* sont spécifiquement stimulées dans les réactions incompatibles de plusieurs génotypes de cotonnier confrontés à diverses races de *Xcm*, supposant que *GbLOX1* pouvait être un marqueur de la RH du cotonnier à la bactériose (Sayegh-Alhamdia *et al.*, 2008). Cette observation va dans le sens de ceux de Montillet *et al.* (2002) pour lesquels l'induction de l'expression de gènes *LOX* est une signature spécifique de la RH. En étudiant le métabolisme des hydroperoxydes au cours des interactions biotiques compatibles et incompatibles dans le tabac et *Arabidopsis thaliana*, ces auteurs ont montré que les oxylipines 9-LOX-dépendantes s'accumulaient dans le tabac infecté soit par le virus de la mosaïque du tabac (*VMT*), soit par la race avirulente de *Ralstonia solanacearum*. Chez *Arabidopsis*, ils ont principalement observé l'accumulation de métabolites de type 13S dans des feuilles en réponse à la harpine, et pendant différentes interactions incompatibles. D'une manière plus générale, dans diverses interactions spécifiques race-cultivar notamment, tabac-*P. parasitica nicotianae* (Véronési *et al.*, 1996), pomme de terre *P. infestans* (Kolomiets *et al.*, 2000), tomate-*Pseudomonas syringae* (Koch *et al.*, 1992), riz-*Magnaporthe grisea* (Peng *et al.*, 1994), les *LOX* sont induites plutôt pendant la résistance que durant la maladie soutenant donc fortement l'idée selon laquelle ces enzymes seraient déterminantes dans l'exécution de la mort cellulaire hypersensible.

Ces dernières années, la transformation génétique a été un outil largement utilisé dans l'étude de la fonction des gènes dans la RH, notamment grâce à la disponibilité de mutants chez *A. thaliana*. Par exemple, le modèle transgénique composé d'un gène codant la protéine avirulente AvrRpm1, ou AvrRpt2 de *P. syringae*, sous le contrôle d'un promoteur inductible par la dexaméthasone a été employé pour étudier le rôle des oxylipines dans la défense. Il a permis de

démontrer que la reconnaissance de cette protéine AvrRpm1 par la plante induit la synthèse des oxylipines 9- ou 13-LOX-dépendantes et l'accumulation d'AJ (Anderson *et al.*, 2006). D'autres éléments soutenant le rôle essentiel des LOX dans la résistance des plantes aux insectes et aux agents pathogènes ont été fournis par des expériences de stimulation ou de suppression de leur fonction. Ce fut le cas chez le tabac où l'activité LOX a été augmentée suite à l'introduction de la *LOX2* d'embryon de soja de spécificité non déterminée (Deng *et al.* 1992) ou d'une LOX (9/13 LOX ?) de concombre (Hause *et al.*, 2000).

Mais à notre connaissance, peu de références mentionnent une approche génétique qui démontre de manière formelle la fonction biologique de gènes *LOX* en utilisant des plantes mutantes altérées dans leur expression. Il a ainsi été démontré que l'inhibition de *LOX* bloquait l'induction des mécanismes de défense chez certaines plantes et engendrait une sensibilité accrue aux agents pathogènes. Les résultats des travaux de Vellosillo *et al.* (2007) vont dans ce sens puisqu'ils révèlent que dans le mutant *noxy2* (nonresponding to oxylipins2) d'*Arabidopsis*, déficient en activité 9-LOX, la perturbation de l'organogénèse racinaire est corrélée à une augmentation de la sensibilité à *Pseudomonas*. Ceci repose sur des mécanismes communs entre réactions de défense et développement racinaire qui corréle la production des oxylipines de la voie des 9-LOX avec le blocage des parasites. Dans le cas de la stratégie antisens, la transformation de plantes de tabac par un ADNc antisens de *LOX*, probablement de type 9, rend ces plantes très sensibles à *P. parasitica* var. *nicotianae* (Rancé *et al.*, 1998). La transformation de plantes de tomates et de pomme de terre par une sonde antisens de *13-LOX* réduit la synthèse des inhibiteurs de protéases chez ces plantes et augmente ainsi leur sensibilités aux insectes (Royo *et al.*, 1999). De façon similaire, la stratégie antisens appliquée au gène *NaLOX3*, une probable 13-LOX, réduit la défense du tabac *N. attenuata* contre l'herbivore *Manduca sexta* (Halitschke and Baldwin, 2003). Les plantes de riz transformées par une sonde antisens d'une *9-LOX3* sont devenues sensibles aux stress abiotiques (sécheresse) et biotiques (bactériose) comparées aux plantes non transgéniques (Nannan *et al.*, 2008).

Le rôle des 9-LOXs a également été appréhendé en utilisant la technique RNA interférant (RNAi) pour supprimer leur expression lors de la réponse de la pomme de terre à l'attaque *P. syringae* pv. *maculicola*. Son activité a ainsi été réduite dans les plantes transgéniques et l'accumulation des oxylipines enzymatiquement produites a été fortement réduite, bien que la quantité de peroxydes de lipides d'origine auto-oxydante ait augmenté (Gobél *et al.*, 2003). Ceci a conduit ces auteurs à suggérer que la mort cellulaire de type hypersensible chez la pomme de terre pourrait être indépendante de l'origine des hydroperoxydes. Des plants de tabac transformés avec la séquence codante *9-LOX1* sous contrôle du promoteur CaMV 35S, ont vu leur sensibilité

diminuer après infection par la race virulente de *P. parasitica nicotianae*. C'était la première démonstration que la surexpression d'un gène 9-LOX est suffisante pour augmenter la résistance chez le tabac en réponse à un oomycète pathogène (Méne-Saffrané *et al.*, 2003). La surexpression d'une 13-LOX chloroplastique *RC11* dans le riz a conduit à l'accumulation des transcrits *PR1* dans les feuilles transformées et à l'activité enzymatique de la protéine transgénique (Zabbai *et al.*, 2004). En outre, l'application exogène de 13-HOT est capable d'induire *PR1*. Ces résultats soutiennent le rôle de *RC11* dans la génération des molécules «signal» pendant l'établissement de la résistance chez le riz.

L'ensemble de ces données suggère donc fortement que les gènes *LOX* sont impliqués dans la régulation des mécanismes de la RH. Il s'appuie non seulement sur le fait que la fonction des LOXs dans les interactions plantes-parasites semble corrélée à la synthèse de composés avec une activité de signalisation (Creelman and Mullet, 1997; Parchmann *et al.*, 1997) ou une activité antimicrobienne (Croft *et al.*, 1993, Weber *et al.*, 1999) mais aussi au développement de la RH (Buonaurio and Servili, 1999; Gobél *et al.*, 2001; Kolomiets *et al.*, 2000; Véronési *et al.*, 1996; Rustérucchi *et al.*, 1999; Montillet *et al.*, 2002). Rustérucchi *et al.* (1999) ont démontré dans le cas du tabac le rôle direct des 9-LOXs dans la peroxydation des lipides durant la RH. Plus précisément, ces auteurs ont révélé que deux LOXs étaient nécessaires à l'installation de la RH: une 13-LOX pour la synthèse de l'AJ et une 9-LOX pour la peroxydation des acides gras, conduisant à la détérioration des membranes et à la mort cellulaire.

La seconde partie de mon projet de thèse s'inscrit donc logiquement dans la continuité des recherches entreprises sur la peroxydation des lipides chez le cotonnier en situation de résistance spécifique. Dans ce cas, la question de la fonction du gène *GhLOX1* dans la stratégie de défense à *Xcm* reste en suspend. Il s'avère donc très intéressant, et nécessaire, d'étudier plus finement le rôle de ce gène dans la HR du cotonnier afin de contribuer à la compréhension générale de la place de cette famille de gènes dans la résistance des plantes.

Le but de mon travail exposé dans ce second chapitre a été d'initier l'analyse fonctionnelle du gène *GhLOX1*. L'obtention de cotylédons de cotonnier transgéniques surexprimant *GhLOX1* par transformation transitoire, outil mis au point dans l'unité (Champion *et al.*, non publiés), a été une étape préliminaire prépondérante pour mener à bien ce projet. L'obtention de lignées transgéniques stables de cotonnier est longue et coûteuse. Les chances de succès sont dépendantes de la variété utilisée, dues essentiellement à des problèmes de régénération *in vitro*. Une alternative serait l'utilisation de la transformation transitoire du cotonnier. Les techniques de transformation du cotonnier sont relativement bien documentées mais concerne principalement la transformation stable de la plante. La co-culture d'*A. tumefaciens* avec des tissus végétaux

(fragments d'hypocotyle ou disques foliaires) et la biolistique (bombardement sur cals ou disques foliaires) sont les approches les plus couramment utilisées.

Ces techniques se heurtent cependant à différents problèmes:

- une faible efficacité de transformation, par exemple seules les cellules du pourtour du disque foliaire co-cultivé avec *A. tumefaciens* sont transformées,
- pas d'utilisation de la plante entière comme matériel transformable, or les tests de pathogénie réalisés au laboratoire sont effectués en serre sur les cotylédons de cotonniers cultivés en pot,
- les tissus sont blessés dès le début de l'expérience (disques foliaires, fragments d'hypocotyle), or la blessure peut générer une activité lipoxygénase «parasite».

Partant du constat (1) qu'il est possible d'infiltrer les cotylédons d'un cotonnier d'environ 10 à 12 jours avec *Xcm* et (2) que l'agroinfiltration est une stratégie de transformation efficace pour de nombreuses espèces végétales, nous avons choisi de tester l'agro-infiltration chez le cotonnier.

Deux questions se sont posées:

- Peut-on transformer de manière efficace les cotylédons du cotonnier par agro-infiltration ?
- L'agro-infiltration est-elle compatible dans le cadre de l'étude du pathosystème *Xanthomonas* / *Gossypium hirsutum* ?

Par ailleurs, Afin de valider cet outil dans le cadre de l'analyse fonctionnelle du gène *GbLOX1* nous avons entrepris une série d'expérimentations complémentaires indispensables à sa mise en œuvre. Un test *in vitro* de compatibilité entre *Agrobacterium* et *Xcm* a été réalisé afin de vérifier d'une éventuelle compétition entre les deux microorganismes. L'effet d'*Agrobacterium* après infiltration *in planta* sur certaines réponses de défense de la plante a également été effectué en étudiant l'induction de deux groupes de gènes, ceux de la voie des octadecanoïdes et ceux codant pour les gènes *GbERF*, les facteurs de transcription de la famille ERF (Ethylen Reponsive Factor). L'ADNc du gène *GbLOX1* disponible dans le laboratoire a facilité l'initiation de l'étude de la fonction de ce gène; différentes constructions ont été générées et introduites dans une souche d'*A. tumefaciens*. Nous avons alors analysé les conséquences de la surexpression du gène *GbLOX1* sur la mise en place de la HR, suivies au plan biochimique par la mesure de l'activité LOX dosée par spectrophotométrie et au plan moléculaire par quantification en temps réel du fonctionnement du gène.

## I. MATERIELS ET METHODES

### A. Matériel végétal

Deux cultivars de cotonnier de *Gossypium hirsutum* âgés de 10-12 jours sont utilisés pour nos expérimentations (i) Réba B-50 qui contient les gènes B<sub>2</sub>B<sub>3</sub> pour la résistance à toutes les races de *Xcm*, y compris la race 18, excepté la race 20 (Hillocks, 1992 ; Innes, 1983) et (ii) Acala 44 qui ne possède pas de gènes de résistance. Ces plantes ont été cultivées en serre sous lumière normale à 24 ou 29°C et à l'humidité relative moyenne de 70%.

### B. Souches bactériennes et préparation des solutions bactériennes

#### 1. Les souches virulentes et avirulentes de la bactérie *Xcm* races 18, 20

Ces souches ont été maintenues à 30°C sur milieu solide Agar de LPG (0.5% extrait de levure de w/v, 0.5% peptone bactériologique de w/v, 0.5% glucose de w/v comme source de carbone, solidifiée avec l'Agar de 1.5% w/v ; Difco, Detroit, MI). Pour l'inoculation, des bactéries sont mises à croître dans 150 ml de milieu de LPG dans un incubateur vibratile à 150 rpm/min à 30°C. Après 18 h, les cultures ont été lavées à l'eau par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min. Le culot bactérien est alors remis en suspension dans l'eau et ajusté par spectrophotométrie pour obtenir une densité optique (600 nm) finale égale à 0,1 correspondant à environ 10<sup>8</sup>cfu /ml.

#### 2. Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*

Différentes souches d'*A. tumefaciens* utilisées (Tableau 1), quelques une destinées pour la transformation transitoire (N°1 à 30), des autres destinées pour étudier l'effet d'*Agrobacterium* sur certaines réponses de défense (N°1, 13 et 31), et une souche destinée pour l'expérience de la fonction biologique du gène *GhLOX1*(N°13). Ces souches ont été cultivées sur un milieu solide Agar de LB contenant les antibiotiques adaptés à la souche d'*A. tumefaciens* utilisée (Rifampicine 20 µg/mL, Kanamycine 50 µg/mL et Gentamicine 40 µg/mL) à 30°C jusqu'à l'obtention des colonies. Une colonie a été ensemencée dans du milieu liquide LB avec les antibiotiques et placée sous agitation (180 tours/min) jusqu'à obtention d'une DO=0.7-0.9 à 29°C. Après centrifugation (15 min à 3000 rpm), le culot a été mis en suspension dans une solution d'infiltration contenant du MgSO<sub>4</sub> à une concentration de 10 mM, du MES de 20 mM et de l'acétosyringone de 200µM pour obtenir une densité optique (600 nm) finale égale à 0,5. L'inoculum a été laissé à température ambiante 2-3h avant la réalisation des agroinfiltrations, et comme témoin négatif, les plantes sont infiltrées par la solution d'infiltration.

#### 3. Les cellules compétentes *Escherichia coli* 10 TOPO (Invitrogen).

Au cours de l'étude sur la fonction biologique du gène *GhLOX1*, deux souches de cellules compétentes d'*E. coli* ont été utilisées et transformées.

#### **a. Les cellules compétentes d'*E. coli* (One Shot® TOP 10)**

Un  $\mu\text{l}$  du vecteur pENTR™/D-TOPO® et 1  $\mu\text{l}$  de solution saline (pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits) ont été ajoutés à 4  $\mu\text{l}$  du produit de la réaction de PCR (mentionné ultérieurement F-2-b). La totalité de ce milieu réactionnel est incubé 20min à 22,5°C. Après cette incubation, 2 $\mu\text{l}$  de milieu réactionnel sont ajoutés à un tube de bactéries compétentes One Shot® TOP 10 *E. coli* (50  $\mu\text{l}$ ) et laissé 30 min dans la glace. Un choc thermique est alors effectué en plaçant successivement le tube 30s à 42°C puis 2 min sur la glace. Du milieu SOC (250  $\mu\text{l}$ ) est ajouté puis le tube est incubé 1h à 37°C. La suspension bactérienne (50 et 100  $\mu\text{l}$ ) est étalée sur des boîtes de Petri contenant du milieu LB agar et de la kanamycine à 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Après une nuit d'incubation à 37°C, seules les bactéries ayant incorporé le vecteur sont résistantes à la kanamycine.

#### **b. les cellules compétentes d'*E. coli* (One Shot® OmniMAX™2T1)**

Les produits des réactions LR (1 $\mu\text{l}$ ) (mentionné ultérieurement F-2-c) ont été utilisés pour transformer des cellules compétentes d'*E. coli* One Shot® OmniMAX™2T1 (50  $\mu\text{l}$ ). Ces cellules sont soumises au même protocole que celui appliqué aux cellules compétentes d'*E. coli* One Shot® TOP10.

### **4. Conditions d'inoculations et de prélèvements**

L'infiltration des cotylédons du cotonnier, âgés de 10-12 jours, par *Xcm* ou *Agrobacterium* est réalisée à l'aide d'une seringue sans aiguille en faisant pénétrer la suspension bactérienne à la face inférieure du cotylédon. Les cotylédons sont prélevés pour les différentes analyses en respectant le cinétique déterminée (0, 9, 15, 24, 48 hpi).

## **C. Transformation transitoire du cotonnier**

Afin d'évaluer l'efficacité de la transformation, trente souches d'*A. tumefaciens* disponibles au laboratoire (Tableau 1) ont été testées. Ces souches possèdent le gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) porteur d'un intron et placé sous le contrôle d'un promoteur fort (pCaMV-35S) ou (pACT). Cinq souches d'*A. tumefaciens* parmi les trente (LBA1119-P35S-*GUS*, LBA4404-P35S-*GUS*, Gv2260-P35S-*GUS*, Gv3101-P35S-*GUS* et AGL1-P35S-*GUS*) ont été retenues. Au cours de ce travail, les 25 souches restant sont comparé avec les 5 souches testées auparavant.

### **1. Test histochimique GUS**

Quarante-huit heures après l'agro-infiltration des cotylédons de cotonnier, et afin de mettre en évidence l'activité du gène *GUS*, les cotylédons transformés ont été mis en présence d'une solution colorante contenant 1 mg/ml de X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D glucuronide), celui-ci va servir de substrat à la  $\beta$ -glucuronidase codée par le gène *GUS* dilué dans

un tampon approprié (20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.25 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 % v/v Triton et Dimethyl sulfoxyde 10%). L'ensemble est placé durant 1h dans une cloche à vide permettant une meilleure infiltration des réactifs dans les différents tissus, puis incubé dans une étuve à 37°C jusqu'au lendemain. Après cette nuit d'incubation, les cotylédons sont placés dans la solution «chlorophyl remove» (45% éthanol 95%, 5% acide acétique glacial, 10% formaldéhyde et 40% H<sub>2</sub>O), permettant la décoloration des tissus, pendant 1h puis et puis dans l'éthanol 95% plusieurs heures.

## 2. Dosage fluorimétrique de l'activité GUS

Les cotylédons transformés ont été prélevés à 0, 24 à 48 hpi et broyés avec du tampon d'extraction (0.1 volume de tampon 10xNa-phosphate/EDTA, 0.1% SLS 10% (N-Laurylsarcosine), 0.1% Triton X-100 10% et 10mM mercaptoethanol).

Dix µg de protéines extraites ont été soumis au dosage enzymatique de l'activité GUS en présence de 1mM de substrat (MUG (4-méthylumbelliféryl-β-D- glucuronide)) dans un volume réactionnel (tampon d'extraction/ MUG) de 200 µl. Une gamme étalon de référence est réalisée par la mesure de la fluorescence de différentes concentrations de 4-méthylumbellifère (MU) à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence (Fluoroskan fluorimeter, Labsystem). La quantité de MU pour chaque échantillon a été rapportée à la gamme étalon. La concentration en protéine a été déterminée en accord avec le protocole décrit par Bradford (1976) avec l'albumine de serum de bovin (BSA) comme protéine standard. L'activité enzymatique GUS est exprimée en quantité de produit synthétisée par unité de temps et rapportée à une même quantité de protéines: pmol MU/min/µg protéine.

## D. L'effet d'*Agrobacterium* sur certaines réponses de défense

Les cotylédons de la variété Réba B50 ont été inoculés par trois souches d'*A. tumefaciens* LBA1119, LBA1119-VIRGN54D ou LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA-intron* et par la solution d'infiltration servant comme control négatif, ils sont prélevés selon la cinétique (0, 9, 15, 24, 48hpi). L'expression du gène *GbLOX1* et deux groupes de gènes, ceux de la voie octadecoroïde : *GbAOS*, *GbAOC2*, *GbACX1a*, *GbACX1b*, *GbACX1c* et *JMT1* (voir introduction générale, figure 12) et les gènes *GbERF*, facteur de transcription de la famille ERF (Ethylen Reponsive Factor) nommés *GbERFIXa1*, *GbERFIXa2* et *GbERFIXa3* (Champion *et al.*, 2009), a été analysé par qPCR. Les séquences des amorces utilisées au cours des QPCR sont présentées dans le tableau 2.



## **E. La compatibilité entre *Agrobacterium* et *Xcm* in vitro.**

La compatibilité entre *Agrobacterium* et *Xcm* a été examinée *in vitro* par une analyse de type «agar-diffusion», comme décrit par Volksch *et al.* (1993). Cette expérience a été effectuée sur les deux milieux solides décrits précédemment (Agar de LPG ou LB). Elle consiste à mettre un inoculum bactérien de *Xcm* 18 ou 20 au contact avec celui-ci de l'une des trois souches d'*A. tumefaciens*, LBA1119, LBA1119-VIRGN54D ou LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA-intron*. Après incubation à 30°C, on recherche l'existence d'inhibition de la croissance (activité antagoniste) de la souche de *Xcm* par celle d'*A. tumefaciens*.

## **F. La fonction biologique du gène *GhLOX1***

### **1. Technologie Gateway: principe**

Une collection de vecteurs binaire (Figure 1) a été choisie afin d'analyser la fonction et de la localisation de protéine d'intérêt GhLOX1 en utilisant le principe de clonage par recombinaison site-spécifique Gateway. La technologie Gateway est basée sur les propriétés du bactériophage  $\lambda$  à infecter les bactéries. L'insertion de l'ADN du phage dans le chromosome bactérien a lieu par recombinaison en des sites spécifiques. L'ADN du phage  $\lambda$  recombine dans le chromosome bactérien en utilisant le site spécifique du phage appelé attP (attachement Phage), et le site spécifique du chromosome bactérien appelé attB (attachement Bactérie). Quand l'ADN du phage  $\lambda$  est inséré dans le chromosome, il est lié par des sites attL et attR qui sont des hybrides des sites attB/attP. Cette insertion est appelée « recombinaison site-spécifique » et fait intervenir des enzymes spécifiques, BP clonase ou LR clonase.

### **2. Obtention des différentes constructions et souches bactériennes**

Afin de comprendre l'effet de la surexpression, de visualiser la localisation intracellulaire et de réaliser l'extinction du gène *GhLOX1* *in planta*, différentes constructions ont été produits à partir du clone d'ADNc du gène *GhLOX1* disponible au laboratoire.

#### **a. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Toutes les PCR ont été réalisées avec le clone d'ADNc du gène *GhLOX1*, selon les instructions des fournisseurs, en utilisant une Taq DNA polymérase du fournisseur Invitrogen). Des amorces spécifiques (Tableau 3) contenant la séquence CACC, nécessaire pour le clonage directionnel (Figure 2), ont été dessinées pour chaque cas. Les conditions de PCR, réalisées dans un volume final de 50  $\mu$ l, étaient les suivantes : 94°C, 1 min ; 35 cycles de 94°C 1min, 55°C 3 min et 72 °C, 3 min et enfin 72 °C, 10 min. Une réaction de PCR a été réalisée avec les oligonucléotides CA-*GhLOX1*F et CA-*GhLOX1*R, et pour effectuer une fusion C-terminal entre *GhLOX1* et GFP, le codon d'arrêt a été supprimé, et la réaction de PCR a été conduite avec les oligonucléotides CA-*GhLOX1*F et CA-*GhLOX1* $\Delta$ StopR.

### **b. Clonage dans le vecteur pENTR /D/TOPO**

Les fragments obtenus avec les couples CA-*GhLOX1F* / CA-*GhLOX1R*, CA-*GhLOX1F* / CA-*GhLOX1ΔStopR*, ont été ligués grâce à la topoisomerase (Figure 2) dans le vecteur pENTR /D/TOPO (Figure 1.A) (Invitrogen, vecteur d'entrée) possédant le site attL. A partir de ces isomérisations, des cellules compétentes d'*E. coli* 10 TOPO ont été transformées et les plasmides vérifiés par le séquençage.

### **c. Une réaction LR**

La réaction LR recombine le clone d'entrée portant la séquence d'intérêt flanqué des sites attL (pENTR /D/TOPO) et un vecteur de destination (pDEST) portant une cassette Gateway flanquée des sites *attR* (Figure 3), les vecteurs de destination sont les suivants: pMDC32 (Figure 1.B) utilisé pour les expériences de surexpression du gène *GhLOX1*, pMDC43 (Figure 1.C) et pMDC83 (Figure 1.D) choisis pour réaliser les fonction C et N-terminale avec la GFP (Curtis et al., 2003). Donc, les clones issus de la PCR avec les oligonucléotides CA-*GhLOX1F* / CA-*GhLOX1R* ont été soumis à une LR avec les vecteurs pMDC32 (contenant un double promoteur 35S) et pMDC43 (qui possède un double promoteur 35S et permet la fusion à la séquence codante de la GFP en position 5'). Les clones issus de la PCR avec les oligonucléotides CA-*GhLOX1F* / CA-*GhLOX1 Δ StopR* ont été soumis à une réaction LR avec le vecteur pMDC83 (qui possède un double promoteur 35S et permet une fusion à la séquence codante de la GFP en position 3'). Les clones issus de la PCR avec les oligonucléotides CA-*GhLOX1F*/CA-*GhLOX1R500*, CA-*GhLOX1F1299*/CA-*GhLOX1R1799*, et CA-*GhLOX1F2098*/CA-*GhLOX1R* ont été soumis à une réaction LR avec le vecteur pBIOS 738 (Figure 1.E). Les produits de ces réactions LR ont ensuite été utilisés pour transformer des cellules compétentes d'*E. coli* TOP10 et les clones positifs ont été vérifiés par le séquençage. Les différents vecteurs binaires obtenus ont ensuite été introduits par électrochoc dans la souche d'*A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D, 2.5 KV, 25μF et 200 Ω, ajout de 1mL de SOC et incubation 1-1.5h à 29°C puis étalement sur milieu LBA, 3jours à 29°C.

## **3. Transformation des cotylédons du cotonnier**

Les solutions bactériennes d'*A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D contenant une des constructions d'intérêt ont été préparées (sauf celles de l'expérience d'extinction) et pour chaque type de traitement, les inoculations des cotylédons sont faites sur des lots de plantes. Certaines sont dédiées à l'observation des symptômes (Reba B-50 et Acala 44), d'autres (Reba B-50) sont prélevées pour des analyses moléculaires ou biochimiques. Nous avons ainsi, pour chaque cas, la cinétique suivante 0, 9, 15, 24 et 48hpi, en utilisant trois plantes par temps.

## **4. Évaluation des activités transcriptionnelles du gène *GhLOX1***

### **a. Extraction des ARN et transcription inverse (RT)**

Les ARN de cotylédons de cotonnier ont été isolés à l'aide du kit (QIAGEN RNEASY) à partir de 100 mg de tissus congelés et broyés dans un mortier dans l'azote liquide. Les ARN ont été dosés par mesure de l'absorbance à 260nm (Nanodrop) en considérant qu'une solution ayant une DO260 égale à 1 contient  $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'ARN. L'intégrité des ARN a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1%. Les ARN (1 $\mu\text{g}$ ) sont convertis en ADNc en utilisant le Kit (Omniscript-Qiagen).

## **b. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt par QPCR**

### **b.1 Principe**

Le principe de la *qPCR* repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction. Des sondes fluorescentes se fixent sur l'ADN double brin (technologie SYBR Green) et ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de *qPCR*. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. Cette valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

Il est important de connaître l'efficacité de la PCR. Pour cela, une PCR en temps réel est effectuée sur des échantillons de dilution sériée pour obtenir une courbe d'amplification qui doit être proche de 100% correspondant au couple d'amorces utilisé. La spécificité est déterminée par la courbe de dissociation qui ne doit révéler qu'un seul produit PCR amplifié. Si ces deux conditions ne sont pas respectées, il est nécessaire de rechercher d'autres couples d'amorces. Les oligonucléotides utilisés sont disponibles dans le tableau 2.

### **b.2 Conditions expérimentales**

La *qPCR* réel est réalisée à l'aide du kit «Mesa green *qPCR* MasterMix plus for SYPR» (eurogentec) dans un volume total de 20  $\mu\text{l}$  incluant (4  $\mu\text{l}$  d'ADNc dilué 10 fois, 0,6  $\mu\text{l}$  de chaque amorce à 10  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{l}$  du Mix 2X qui contient la taq polymérase, les nucléotides) et 4,8  $\mu\text{l}$  d'eau stérile. Des témoins sans ADNc ont été réalisés. Le programme PCR est le suivant: une étape de 2 min à 50°C suivie d'une seconde étape à 95°C pendant 10 min (phase de dénaturation), puis 45 cycles à 95°C/15s, 58°C/20s, 72°C/40s et un cycle de dissociation à 95°C/1 min, 60°C/30s, 95°C/30s sur un thermocycleur MX 3500P (Stratagene). En fin de réaction, l'expression des gènes est calculée à partir du logiciel MXPro, et les valeurs obtenues sont normalisées par rapport à celles obtenues pour l'expression du gène de l'actine, *GhACT2* (Champion *et al.*, 2009) considéré comme normalisateur et par rapport au calibrateur (T0, temps avant l'infection).

### 5. Évaluation des activités totale de lipoxygénase

Des extraits de cotonnier ont été préparés selon le procédé décrit par Rustérucci *et al.*, (1999) sur 1 g de tissus congelés de cotylédon transformé. L'extrait (0.5 ml) a été incubé pendant 20 min à 25°C avec 1 ml de la solution tampon de phosphate de sodium 250 mM (pH 7) et 5 µl d'une solution éthanolique d'acide linoléique (100 mM). La réaction enzymatique a été arrêtée par l'addition de 70 µl de HClO<sub>4</sub> (12 N) ; les hydroperoxydes d'acides gras ont été extraits dans 2 ml d'hexane. Après avoir été bien mélangé (Vortex) l'absorbance à 234 nm de la phase organique supérieure a été mesurée au spectrophotomètre (Uvikon 922 ; Kontron, Marseille, France) contre un témoin contenant de l'hexane. La concentration en protéine a été déterminée en accord avec le protocole décrit par Bradford (1967) avec la (BSA) comme protéine standard. L'activité enzymatique est exprimée en picokatal par mg<sup>-1</sup> protéine en utilisant un coefficient d'extinction molaire pour les diènes conjugués de 25 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### G. Microscopie à fluorescence

Les cotylédons infiltrés et transformés avec des souches d'*A. tumefaciens* contenant le gène *GhLOX1* fusionné au gène codant la GFP dans sa partie N-terminale ou C-terminale et placé sous le contrôle du promoteur 35S, ont été examinés par microscopie à fluorescence à 470 nm (Leica MZ FLIII), longueur d'onde d'excitation pour la GFP.

## II. RESULTATS

### A. Mesure de l'activité GUS

Puisque l'agroinfiltration est une stratégie de transformation efficace pour de nombreuses espèces végétales, nous avons choisi de l'appliquer au cotonnier en prenant soin de vérifier son efficacité et sa compatibilité dans le cadre de l'étude du pathosystème *Xcm/G. hirsutum*.

Les cinq souches d'*Agrobacterium* testées (LBA1119-P35S-GUS, LBA4404-P35S-GUS, Gv2260-P35S-GUS, Gv3101-P35S-GUS et AGL1-P35S-GUS) ont montré des activités GUS significatives (Figure 4) comparées à celles obtenues avec les autres souches (résultats non montrés). Ces cinq souches possèdent le gène rapporteur de la β-glucuronidase porteur d'un intron et placé sous le contrôle d'un promoteur fort (35S). L'activité GUS peut être suivie et dosée facilement dans les tissus transformés. Il est possible de détecter une activité GUS pour toutes les souches utilisées dès 24 hrs PI, avec un maximum à 48 hrs (Figure 4). Dans le but d'optimiser l'efficacité du transfert de l'ADNT, différents paramètres ont été testés comme la

température des serres et la concentration en bactéries. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives.

S'il est possible de détecter une activité GUS, celle-ci est au moins 10 fois inférieure à celle obtenue chez le tabac (résultats non montrés). C'est pourquoi le système de transformation nommé « ternaire » a été testé. Ce système a permis pour de nombreuses espèces végétales d'augmenter la fréquence du transfert de l'ADN-T (Van der Fits *et al*, 2000). Schématiquement, après contact entre les agrobactéries et les cellules végétales blessées, les composés phénoliques, les oses et un pH acide vont créer un environnement favorable à l'induction des gènes *vir*. Le facteur de transcription VirG activé par phosphorylation peut induire l'expression des gènes *vir* nécessaire au transfert de l'ADN-T. Le système ternaire utilise une forme mutée de la protéine virG (*virGN54D*) mimant la forme active. Ce système a été introduit dans deux souches d'agrobactéries (LBA1119 et AGL1). Dans les deux cas (LBA1119 et AGL1), la présence de *virGN54D* permet d'augmenter de manière significative l'activité GUS (facteur supérieur à 10). De plus, les analyses histochimiques mettent en évidence la présence de cristaux indigo au niveau de l'ensemble de la zone infiltrée (Figure 5). L'étude qualitative et quantitative de l'activité  $\beta$ -glucuronidase démontre que l'agroinfiltration combinée au système ternaire est une approche efficace pour la transformation génétique transitoire du cotonnier.

D'autre part, L'analyse de la compatibilité dans le pathosystème *Xanthomonas* / *G. hirsutum* montre qu'en présence d'agrobactéries, les souches virulente ou avirulente de *Xanthomonas* sont capables d'induire la maladie ou le phénotype de la RH. En outre, en présence de *Xanthomonas*, une activité  $\beta$ -glucuronidase est détectable *in planta*, démontrant la viabilité des souches d'*A. tumefaciens*.

## **B. Compatibilité entre *Agrobacterium ssp.* et *Xcm in vitro*.**

Après avoir mis en contact les souches de *Xcm* 18 ou *Xcm* 20 avec celles d'*A. tumefaciens* (LBA1119, LBA1119-VIRGN54D ou LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA*-intron) (Figure 6) sur deux milieux, Agar de LPG ou LB, aucune activité antagoniste n'a été observée entre-elles. Ceci permet de penser qu'il est probable qu'il n'y ait pas de compétition importante de croissance *in planta* entre les souches testées.

### C. Effet d'*Agrobacterium* sur certaines réponses de défense de la plante agrotransformée.

L'activité totale LOX soit dans les cotylédons «témoins» agro-transformés (souche LBA1119 surexprimant la *GFP* ou sans vecteur binaire) à 15hpi précédée par l'expression du gène *GbLOX1* à 9hpi nous a conduit à penser que d'*Agrobacterium* puisse induire des mécanismes de défense. C'est pourquoi l'analyse par qPCR de l'expression d'un certain nombre de gènes de cotonnier supposé être associé à la défense contre *Xcm* a été entrepris. Nous avons retenu les gènes suivants: le gène *GbLOX1*, dont l'induction est étroitement liée à la HR (voir chapitre 1 et Sayegh-Alhambdia *et al.*, 2008), des gènes de la voie des octadecanoïdes (*GhAOS*, *GhAOC2*, *GhACX1a*, *GhACX1b*, *GhACX1c* et *JMT1*) et des gènes codant pour les facteurs de transcription de la famille ERF (*GhERF1a1*, *GhERF1a2*, *GhERF1a3*) (Champion *et al.*, 2009).

L'expression des différents gènes analysés est normalisée par rapport au calibrateur, T0, et au normalisateur, le gène d'actine *GhACT2b*. Suite à l'inoculation des cotylédons de la variété Réba B50 par l'une des trois souches d'*A. tumefaciens* LBA1119, LBA1119-VIRGN54D ou LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA*-intron sur une cinétique comprenant 5 points (0, 9, 15, 24 et 48h).

La réponse de chaque gène a été enregistrée comparer avec le témoin négatif (cotylédons infiltrée par la solution d'infiltration (Figure 7).

L'expression du gène *GbLOX1* augmente à 9hpi d'un facteur 9, 4 ou 5 en réponse à *A. tumefaciens* LBA1119, LBA1119-VIRGN54D ou LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA*-intron respectivement. Son intensité diminue ensuite rapidement entre 15h et 48h (Figure 7, A) De la même manière, l'expression de *JMT1* est induite qu'à 9 hpi en réponse aux trois souches d'*A. tumefaciens* (facteur 57, 44 ou 65 respectivement) (Figure 7, D). L'expression du gène *GhAOS* augmente à 9 et 15hpi en réponse aux trois souches *A. tumefaciens* et atteint un maximum (facteur 30) à 15h en réponse à *A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D et reviens, à 24 et 48hpi, à son niveau basal observé à T0 (Figure 7, B). Le niveau de transcription du gène *GhERF1a1* présente presque le même profil d'expression que celui du gène *GhAOS*. Son expression est induite à 9 et 15hpi en réponse à *A. tumefaciens* LBA1119, LBA1119-VIRGN54D mais qu'à 9hpi au cas d'*A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA*-intron (Figure 7,C).

En revanche, l'effet des trois souches d'*A. tumefaciens* est quasiment nul sur l'expression des gènes *GhAOC2*, *GhACX1a*, *GhACX1c* et *GhERF1a2* pour lesquels nous n'avons observé aucune induction (Figure 7, F-G-H-E) Enfin, les trois souches d'*A. tumefaciens* LBA1119, LBA1119-VIRGN54D ou LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA*-intron ont un effet réprimant de l'expression des gènes *GhACX1b* et *GhERF1a3* (Figure 7, I-J).

## D. Analyse fonctionnelle du gène *GhLOX1*

### 1. Les constructions générées

Afin d'identifier le rôle que le gène *GhLOX1* pourrait jouer dans la mise en place de la HR chez le cotonnier, dans un premier temps, une stratégie a été développée pour tenter de surexprimer ce gène dans les tissus de cotylédons. La construction suivante a donc été réalisée et testée : **-p35S-GhLOX1** (Figure 8) qui contient l'ADNc du gène *GhLOX1* placé sous le contrôle d'un double promoteur constitutif 35SCaMV

Dans un deuxième temps deux constructions ont été réalisées et testées pour l'observation de la localisation intracellulaire de la protéine GhLOX1 (Figure 9):

- **p35S-GhLOX1-GFP6** qui contient l'ADNc du gène *GhLOX1* placé sous le contrôle d'un double promoteur constitutif 35S et fusionné à la *GFP6* en C-terminal.

- **p35-GFP6-GhLOX1** qui renferme l'ADNc du gène *GhLOX1* placé sous le contrôle d'un double promoteur constitutif 35S et fusionné à la *GFP6* en N-terminal.

Comme control négatif, la construction **p35S-GFP6** (Figure 10) constituée d'un vecteur contenant le gène de la *GFP6* placé sous le contrôle du double promoteur constitutif 35SCaMV a été utilisée. Chaque construction a été introduite dans une souche d'*A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D et utilisée dans les expérimentation d'expression transitoire. Les conséquences de cette expression transitoire ont été analysées sur l'activité totale de LOX, la transcription du gène *GhLOX1*, le phénotype des cotylédons agrotransformés et la localisation de la protéine GhLOX1 dans les cotylédons agrotransformés contenant GFP.

### 2. Effet de la surexpression du gène *GhLOX1*

#### a. Évaluation de l'activité LOX totale

A l'aide d'une approche biochimique, les activités LOX ont été mesurées dans tous les cotylédons transformés possédant l'une de ces constructions : *p35S-GhLOX1* ou *p35S-GFP6* (Figure 11) et dans les cotylédons non transformés infectés par la race 18 de *Xcm* servant de témoin positif (interaction incompatible) (Figure 12). Les plantes de cotonnier ont été cultivées à 30°C ou 24°C et les prélèvements réalisés à 0, 15, 24 et 48hpi. L'activité totale LOX dans les cotylédons agrotransformés (*p35S-GhLOX1*) des plantes cultivées à 30°C ou 24°C ont été les plus importantes à 48 hpi, 72 pkat/ mg protéine et 160 pkat/ mg protéine, respectivement. Les dosages effectués pour les plantes cultivées à 30°C ont montré que l'activité LOX augmente dans les cotylédons surexprimant *GhLOX1* comparée à celle mesurée dans les plantes «témoin» (*p35S-GFP6*). En effet, l'activité LOX dosée dans les plantes du témoin négatif (*p35S-GFP6*) est faible avec un léger pic à 15hpi (15 pkat/ mg protéine). L'activité LOX mesurée pour les plantes cultivées à 24°C a été plus forte dans tous les cotylédons transformés (*p35S-GhLOX1* et *p35S-*

*GFP6*) comparée à l'expérience réalisée à 30°C. Le maximum d'activité, 173 pkat/mg protéine a été atteint à 24hpi dans les cotylédons surexprimant le gène *GhLOX1*. Dans les cotylédons qui expriment la GFP on observe une augmentation de l'activité lipoxygénase de manière rapide (dès 9hpi, 90 pkat/mg), suivi par une diminution de cette activité de 39 pkat/mg à 24 hpi.

### **b. Évaluation des activités transcriptionnelles du gène *GhLOX1***

L'expression du gène *GhLOX1* dans les cotylédons a été quantifiée par Q-RT-PCR au cours du temps à 0-9-15-24-48 hpi (Figure 13). Dans les cotylédons des plantes «témoin» uniquement inoculés par la souche bactérienne *LBA1119-VirGN54D*, l'expression du gène *GhLOX1* présente un maximum d'activité à 9hpi avec un facteur 6.8 et un minimum à 48hpi (facteur 0.69). Chez les plantes transformées par *A. tumefaciens* contenant la construction (*p35S-GFP6*), servant comme témoin négatif, la transcription du gène *GhLOX1* est également maximale à 9hpi (facteur 9.58) pour décroître jusqu'à un facteur 0.97 à 48hpi. En analysant les cotylédons agrotransformés avec la construction *p35S-GhLOX1*, le niveau d'expression du gène *GhLOX1* semble être affecté ; il présente une augmentation de la quantité de transcrits du gène *GhLOX1* à 48hpi (facteur 12.69) comparé à celui mesuré dans les témoins négatifs, les lignées contrôles agrotransformées avec la construction (*p35S-GFP6*) et les cotylédons infectés uniquement par la souche bactérienne *VirGN54D*.

### **c. Analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés**

Trois analyses phénotypique ont été effectuées, chacune d'entre-elles correspond à une étape importante dans la recherche de la fonction du gène *GhLOX1* dans les cotylédons de cotonnier agrotransformés.

Lors de la première analyse (Figure 14), on a observé les symptômes développés sur les cotylédons agrotransformés de la variété Réba B-50 contenant la construction *p35S-GhLOX1* permettant la surexpression du gène *GhLOX1* et sur les témoins négatifs qui sont les cotylédons inoculés par la souche d'*A. tumefaciens* (**LBA1119-VirG54D**) contenant la construction *p35S-GFP6* ou par la souche de *A. tumefaciens* LBA1119-VirG54D. Les résultats démontrent que l'infiltration des cotylédons par les souches d'*A. tumefaciens* *LBA1119-VirG54D* contenant la constructions d'intérêt (*p35S-GhLOX1*) n'induit pas l'apparition des symptômes de la RH. Des résultats similaires ont été obtenus dans les témoins négatifs.

Au cours de la deuxième analyse phénotypique (Figure 15) nous avons injecté les substrats de LOX, C18 :2 et C18 :3 (10mM dans une solution de Tween à 0.5%), dans le tiers du cotylédon de la variété Réba B-50 à la face inférieure 24h après la transformation de ces cotylédons afin d'observer les symptômes développés au cours de l'interaction. Comme contrôle négatif, des cotylédons agrotransformés ont été infiltrés par un acide gras en C18 :1 qui n'est pas



le substrat des LOX ou par la solution de Tween. Des résultats identiques à ceux obtenus lors de la première analyse ont été acquis. Aucun symptôme de RH n'a été détecté dans les cotylédons agrotransformés possédant les constructions (*p35S-GbLOX1*) ainsi que dans les témoins négatifs. Mais après l'infiltration par les substrats de LOX, des taches huileuses ont été observées 1,5hpi dans les cotylédons non agrotransformés uniquement infiltrés par l'un des deux substrats de LOX, C18:3 ou C18:2. Les mêmes symptômes ont été observés à 1,5hpi dans les cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1*) et inoculés après 24h par les substrats C18:3 ou C18:2. Ces symptômes se distinguaient dans tous les cas par des taches huileuses très fortes montrant des tissus infectés translucides. Par contre, aucune tache huileuse n'a été observée dans le cas des cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1* ou *p35S-GFP6*) et infiltrés par l'acide gras C18 :1 ou par la solution de Tween.

Concernant la troisième analyse phénotypique, (Figure 16 et 17), nous avons travaillé avec des cotylédons des variétés Réba B-50 et Acala 44 infiltrés par les races 20 ou 18 de *Xcm* dans un tiers du cotylédon, 48h après l'agrotransformation car la mesure de l'activité totale LOX dans les cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1*) a montré qu'elle était maximale à 48hpi. Les contrôles ont consisté en des cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1*) (Figure 16) et (*p35S-GFP6*) (Figure 17) non infectés par les races 20 ou 18 de *Xcm*. Dans ce cas, le phénotype de la variété Acala44 s'est caractérisé par des chloroses à partir du deuxième jour, ce qui n'était pas le cas avec la variété non infectée Réba B-50 pour laquelle aucune chlorose n'a été remarquée, même le cinquième jour après la transformation. Par contre la chlorose a été plus forte sur les cotylédons de la variété Acala44 au cinquième jour. Suite à l'inoculation par la race virulente 20, le symptôme de chlorose a été observé sur les cotylédons des variétés Réba B-50 et Acala44 agrotransformés (*p35S-GbLOX1*, *p35S-GFP6*). Mais cette apparition de chlorose dans le cas de la variété Acala44 a été plus précoce (2 jour post-infiltration, jpi) que celle observée chez la variété Réba B-50 (5 jpi). Après inoculation par la race avirulente 18 des cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1*), on a observé les symptômes de la RH 48hpi sur tous les cotylédons de la variété Réba B-50 et le témoin agrotransformé (*p35S-GFP6*). Concernant les plantes « témoin » (*p35S-GFP6*), des symptômes de chlorose concomitant à des taches nécrotiques ont été observés 5 jpi sur un des trois cotylédons, alors que les deux autres ne présentaient que des chloroses. Les cotylédons de la variété Acala44 transformés par la souche d'*A. tumefaciens* contenant la construction *p35S-GbLOX1*, montrent des taches nécrotiques apparues 5 jpi sur les trois cotylédons.

### 3. Etude de la localisation intracellulaire de la protéine GhLOX1 dans les cotylédons transformés

La détermination de la localisation intracellulaire de la protéine GhLOX1 est un point important permettant d'obtenir des données supplémentaires quant à sa fonction potentielle. C'est pourquoi des expériences d'expression de protéines de fusion entre GhLOX1 et la GFP ont été réalisées *in planta*. Des cotylédons ont été transformés avec les deux constructions permettant la fusion entre GhLOX1 et la GFP de manière à déterminer la localisation de la protéine GhLOX1. Ces cotylédons ont été examinés par microscopie à fluorescence (Leica MZ FLIII). En outre, nous nous sommes également attachés à évaluer l'activité LOX totale, l'activité transcriptionnelle du gène *GhLOX1* et l'analyse phénotypique dans ces cotylédons agrotransformés.

#### a. Localisation de la protéine *GhLOX1* par microscopie à fluorescence

Les premières expériences réalisées sur les cotylédons contenant le gène *GhLOX1* fusionné au gène codant la GFP dans sa partie N-terminale ou C-terminale et placé sous le contrôle du promoteur 35S, ont été prélevés à 24 ou 48 hpi et examinés par microscopie à fluorescence n'ont pas permis de mettre en évidence de fluorescence de la GFP. L'absence de détection de la GFP en microscopie à fluorescence indique que les conditions dans lesquelles ces expériences ont été réalisées ne sont peut être pas optimales, et que la protéine GFP est présente dans ces conditions à des niveaux très faibles et non détectables. Il sera donc nécessaire de réaliser ces mêmes expériences dans des conditions différentes, notamment sur des cotylédons contenant le gène *GhLOX1* fusionné au gène codant la GFP dans sa partie N-terminale ou C-terminale et placé sous le contrôle du promoteur propre (spécifique) du gène *GhLOX1*. En confirmation, nous évaluerons l'activité biochimique de la protéine et la transcription du gène *GhLOX1* dans ces constructions qui sont destinées à l'observation de la localisation intracellulaire de la protéine permettant de s'assurer que ces activités sont bien stimulées dans ces cotylédons agrotransformés contenant la GFP.

#### b. Évaluation de l'activité LOX totale

L'activité LOX totale a été mesurée dans les cotylédons agrotransformés possédant l'une des deux constructions : *p35S-GhLOX1-GFP6* ou *p35S-GFP6-GhLOX1* et dans les cotylédons « témoin négatif » contenant (*p35S-GFP6*). Les plantes de cotonnier ont été cultivées à 30°C ou 24°C et les prélèvements réalisés à 0, 15, 24 et 48hpi (Figure 18). L'activité LOX mesurée pour les plantes de la condition « 24°C » a été plus forte dans tous les cotylédons transformés (*p35S-GhLOX1-GFP6*, *p35S-GFP6-GhLOX1* et *p35S-GFP6*) que celle des plantes de la condition « 30°C ». Les dosages effectués pour les plantes de la condition « 30°C » ont montré

que l'activité LOX augmentent progressivement dans les cotylédons agrotransformés (*p35S-GhLOX1-GFP6* et *p35S-GFP6-GhLOX1*) comparée à celle mesurée dans les plantes « témoin négatif » (*p35S-GFP6*). Ces activités LOX dans les cotylédons (*p35S-GFP6-GhLOX1*) ont été plutôt stabilisées entre 15hpi (51 pkat/ mg protéine) et 48 hpi (57 pkat/ mg protéine), ainsi que dans les cotylédons transformés (*p35S-GhLOX1-GFP6*), 15hpi (41 pkat/ mg protéine) et 48 hpi (44 pkat/ mg protéine). Par contre, l'activité LOX dosée dans les plantes du témoin négatif (*p35S-GFP6*) est faible avec un léger pic à 15hpi (15 pkat/ mg protéine).

Dans la condition 24°C, le maximum d'activité (96 pkat/mg protéine) a été atteint à 24hpi dans les cotylédons possédant la construction (*p35S-GFP6-GhLOX1*). Une diminution de l'activité totale LOX dans les cotylédons transformés (*p35S-GhLOX1-GFP6*) a été remarquée entre 15 et 24hpi (149 à 58 pkat/mg protéine) mais elles remontent à 48hpi (108 pkat/mg protéine). Alors que dans les plantes du témoin négatif (*p35S-GFP6*), un pic d'activité a été évalué à 15hpi suivi par une diminution à 24hpi (80 à 39 pkat/mg protéine) (résultats mentionné D-2-a),

Ainsi, les résultats obtenus montrent que les cotylédons agrotansformés contenant la GFP (*p35S-GhLOX1-GFP6* et *p35S-GFP6-GhLOX1*) présentent généralement une activité LOX significativement différente de celle obtenue dans les cotylédons servant de témoin négatif (*p35S-GFP6*).

### c. Évaluation par Q-PCR de l'activité transcriptionnelle du gène *GhLOX1*

L'expression du gène *GhLOX1* dans les cotylédons contenant la GFP (*p35SGhLOX1-GFP6* et *p35S-GFP6-GhLOX1*) (Figure 19), dans les cotylédons des plantes des témoins négatifs (*p35S-GFP6*) et dans les cotylédons non transformés infectés par *A. tumefaciens* LBA1119-*VirGN54D*, servant aussi comme témoin négatif, a été quantifiée par Q-PCR au cours du temps à 0-9-15-24-48 hpi. Les résultats des plantes servent comme témoins négatifs (*p35S-GFP6*) et les cotylédons non transformés infectés par *A. tumefaciens* LBA1119-*VirGN54D* ont déjà montré (D.2.b). Dans ces cotylédons des plantes «témoin négatif» l'expression du gène *GhLOX1* est induite rapidement (9hpi) et de manière transitoire et ils présentent un minimum d'activité à 48hpi. L'expression du gène *GhLOX1* dans les cotylédons agrotransformés avec la construction (*p35S-GFP6-GhLOX1*) est plutôt stable à 9, 24, 48 hpi, avec des facteurs de 6.6 à 5.5 et un minimum d'induction atteint à 15hpi (facteur 2.64). Dans les cotylédons agrotransformés avec la construction (*p35S-GhLOX1-GFP6*), le profil d'expression du gène *GhLOX1* montre une augmentation progressive d'induction de 9 à 48hpi, le maximum d'induction étant atteint à 48hpi (facteur 9.3). Il est intéressant de noter que les cotylédons qui expriment fortement le gène *GhLOX1* sont ceux qui contiennent la construction (*p35S-GhLOX1-*

*GFP6*) ou (*p35S-GFP6-GbLOX1*) pour lesquelles l'activité transcriptionnelle est plus forte à 48 hpi, supérieure à celles mesurées dans les plantes des témoins négatifs.

#### **d. Analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés**

Les mêmes méthodes ont été suivies pour l'observation phénotypique des différentes inoculations comme dans la partie D.2.c. Trois analyses ont été effectuées et les symptômes ont été observés et décrits pour chaque traitement.

Les résultats de la première analyse (Figure 20) démontrent que l'infiltration des cotylédons par les souches d'*A. tumefaciens* *LBA1119-VirG54D* contenant les constructions (*p35S-GFP6-GbLOX1*, *p35S-GbLOX1-GFP6* ou *p35S-GFP6*) ou par la souche d'*A. tumefaciens* *LBA1119-VirG54D*, elle-même, n'induit pas l'apparition des symptômes de la RH. Dans la deuxième analyse (Figure 21), nous avons injectés, 24h après la transformation, les substrats de LOX, C18:2 et C18:3 (10mM dans une solution de Tween à 0.5%) ou par des contrôles négatifs (un acide gras C18:1 qui n'est pas le substrat ou par la solution de Tween) dans le tiers du cotylédon de la variété Réba B-50 à la face inférieure afin d'observer les symptômes développés au cours de cette analyse. Des taches huileuses très fortes (translucides) ont été observées 1,5hpi dans les cotylédons soit non agrotransformés ou agrotransformés (*p35S-GbLOX1-GFP6*, *p35S-GFP6-GbLOX1* et *p35S-GFP6*) infiltrés, 24h après la transformation, par l'un des deux substrats de LOX, C18:3 ou C18:2. Par contre, aucune tache huileuse n'a été observée dans le cas des cotylédons non agrotransformés ou agrotransformés (*p35S-GbLOX1-GFP6*, *p35S-GFP6-GbLOX1* et *p35S-GFP6*) et infiltrés, 24h après la transformation, par l'acide gras C18:1 ou par la solution de Tween.

Au cours de la troisième analyse (Figure 22 et 23), les cotylédons agrotransformés (*p35SGbLOX1-GFP6* (Figure 22), *p35S-GFP6-GbLOX1* (Figure 23). et *p35S-GFP6* (Figure 17)) des variétés Réba B-50 et Acala 44 ont été infiltrés, 48h après l'agrotransformation, par les races 20 ou 18 de *Xcm* dans un tiers du cotylédon. Les plante contrôles ont consisté en des cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1-GFP6*, *p35S-GFP6-GbLOX1* et *p35S-GFP6*) non infectés par les races 20 ou 18 de *Xcm*. Dans ce cas, le phénotype de la variété Acala44 s'est caractérisé par des chloroses à partir du deuxième jour, ce qui n'était pas le cas avec la variété Réba B-50 pour laquelle aucune chlorose n'a été remarquée, même le cinquième jour après la transformation. Suite à l'inoculation par la race virulente 20, le symptôme de chlorose a été observé sur les cotylédons des variétés Réba B-50 et Acala44 agrotransformés (*p35S-GbLOX1*, *p35S-GbLOX1-GFP6*, *p35S-GFP6-GbLOX1* et *p35S-GFP6*). Mais cette apparition de chlorose dans le cas de la variété Acala44 a été plus précoce (2 jpi) que celle observée chez la variété Réba B-50 (5 jpi). Après inoculation par la race avirulente 18 des cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1*, *p35S-*

*GbLOX1-GFP6* et *p35S-GFP6-GbLOX1*), on a observé les symptômes de la RH 48hpi sur tous les cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1-GFP6*, *p35S-GFP6-GbLOX1* et *p35S-GFP6*) de la variété Réba B-50. Dans la variété Acala44, les cotylédons agrotransformés (*p35S-GbLOX1-GFP6* et *p35S-GFP6-GbLOX1*), les symptômes de chlorose ont été observés à partir du deuxième jour, ce chlorose à été plus intense au cinquième jour mais dans les plantes «témoin» (*p35S-GFP6*) (mentionné précédemment D.2.c) des symptômes de chlorose conjugué à des taches nécrotiques ont été observés 5 jpi sur un des trois cotylédons, alors que les deux autres ne présentaient que des chloroses.

#### IV. DISCUSSION

Dans des travaux antérieurs, un ensemble d'observation tend à démontrer que l'inhibition des activités LOX, tant au plan moléculaire que biochimique, bloque l'induction de mécanismes de défense chez certaines plantes et engendre une sensibilité accrue aux agents pathogènes. C'est ainsi que la résistance à *Phytophthora* a été perdue dans les tabacs transgéniques antisens-LOX1 (Rancé *et al.*, 1998). La réduction de la synthèse d'inhibiteurs de protéases chez des plants de tomate et de pomme de terre transgéniques antisens-13-LOX augmente leur sensibilité aux insectes (Royo *et al.*, 1999). De même, une augmentation de la sensibilité à *Pseudomonas* a été observée chez le mutant *noxy2* d'*Arabidopsis*, déficient en activité 9-LOX (Vellosillo *et al.* 2007) à l'image de *N. attenuata* antisens-*NaLOX3* dont la défense contre l'herbivore *Manduca sexta* a été réduite (Halitschke and Baldwin, 2003). Des faits similaires ont été rapportés chez des plants de riz antisens 9-LOX3 devenus sensibles aux stress abiotiques et biotiques (Nan-nan *et al.*, 2008). Enfin, l'accumulation d'oxylipines d'origine enzymatique a été fortement réduite dans les plantes transgéniques de pomme de terre infectées par *P. syringae* pv. *maculicola* (Gobél *et al.* 2003).

A l'inverse, Méne-Saffrané et ses collaborateurs (2003) ont publié des travaux proposant que la surexpression d'un gène 9-LOX était suffisante pour augmenter la résistance du tabac en réponse à *P. parasitica nicotianae*. Dans notre étude, et afin d'apprécier l'effet de la surexpression de ce gène LOX, quatre lignées de tabac ont été transformées avec la séquence codante *LOX1* fusionnée au promoteur CaMV 35S. Ces plantes ont révélé une activité LOX 2 à 5 fois supérieures à celle des plantes non transformées, une accumulation constitutive significative de la protéine LOX et un phénotype sans modifications apparentes par rapport à celui des plantes sauvages.

Chez le riz, la surexpression d'une 13-LOX chloroplastique *RC11* a conduit à l'accumulation des transcrits *PR1* dans les feuilles transformées (Zabbai *et al.* 2004). En outre,

l'application exogène de 13-HOT, une oxylipine dérivant de la voie de 13-lipoxygénase, est capable d'induire le gène *PR1*. Ces résultats soutiennent un rôle pour *RC11* dans la génération de molécules de signalisation pendant l'établissement de la résistance acquise chez le riz.

Dans ce contexte, des plantes transgéniques d'orge qui surexpriment une 13-lipoxygénase ont été capables de modifier la signature des oxylipines indiquant un lien entre la production constitutive de 13-LOX et la sénescence. Dans ces plantes au phénotype inchangé, la protéine correspondante s'accumule constitutivement à des niveaux semblables à celui des plantes sauvages traitées par le MeJA. Elle a été détectée par des techniques d'immunocytochimie dans les chloroplastes des plantes non traitées contenant l'ADNc de la 13-LOX (Sharma *et al.*, 2006).

En s'appuyant sur ces données bibliographiques qui rapportent que des protéines LOXs peuvent être étroitement impliquées dans la défense et la régulation des mécanismes de la RH, nous avons décidé au laboratoire d'entreprendre l'analyse fonctionnelle du gène *GhLOX1* du cotonnier en réponse à *Xcm* et dont les premières étapes sont exposées dans le chapitre 2 de ce manuscrit. L'une des approches permettant de confirmer et de comprendre le rôle du gène *GhLOX1 in planta* et notamment celui dans la défense des plantes du cotonnier a été d'étudier l'effet de la surexpression du gène *GhLOX1* par des analyses d'expression transitoire dans les cotylédons de cotonnier.

La transformation transitoire du cotonnier a été une étape préliminaire importante pour mener à bien la surexpression du gène *GhLOX1*. Il est cependant nécessaire de rappeler qu'au début de l'utilisation d'*Agrobacterium* dans la transformation génétique des plantes, la connaissance fine des événements moléculaires qui se produisent pendant l'interaction entre l'agrobactérie et les cellules de la plante étaient peu approfondies. En particulier, très peu de données ont été acquises au sujet de la participation des facteurs de la plante pendant le processus de la transformation par *Agrobacterium*. A notre connaissance, les données de la littérature montrant que la transformation réalisée avec l'agrobactérie est capable d'induire des gènes de la défense sont fragmentaires. Une étude récente a cependant prouvé que des souches désarmées d'*Agrobacterium* induisent des réponses distinctes une fois infiltrées dans des feuilles de tabac. Les réponses sont limitées à la zone infiltrée et se traduisent par l'induction de l'expression du gène *PR-1* et une augmentation de la résistance à une infection ultérieure par le virus de la mosaïque du tabac (Pruss *et al.*, 2008). Veena *et al.*, (2003) ont aussi signalé que l'infection par *Agrobacterium* mène à l'expression différentielle de nombreux gènes de la plante activés précocement. Cette induction représente une réponse générale à toutes les souches d'*Agrobacterium* testées. Ces gènes de défense sont cependant réprimés aux stades avancés du processus de transformation. Dans cet ordre

d'idées, il a aussi été démontré que des réponses de la défense ont été induites après le traitement de cultures de suspension cellulaire d'*Ageratum* par *Agrobacterium* ou par *Escherichia coli* (Ditt *et al.*, 2001). Ces auteurs ont spéculé que l'induction des gènes de la défense de la plante pourrait résulter du transfert de certains facteurs solubles à partir des bactéries vers les cellules hôtes.

C'est pourquoi, dans notre travail, nous avons d'abord essayé de mieux comprendre l'étape de transformation, de rechercher une éventuelle expression des gènes de la plante pendant la transformation et d'appréhender une possible relation entre les deux bactéries utilisées pour nos expériences, *Agrobacterium* et *Xcm*. Les souches d'*Agrobacterium* testées se distinguaient entre-elles par leur composante moléculaire : LB1119 vide, LB1119 contenant la protéine Vir et LB1119 contenant la protéine Vir et le gène rapporteur *gusA-intron*. Les gènes testés, *GhLOX1*, ceux de la voie de biosynthèse du JA et certains gènes de la famille ERF, ont été différenciellement exprimés pendant les étapes initiales de la transformation (réprimés, induits ou non induits). Dans le cas des gènes induits, cette induction a été rapide et transitoire à 9 et /ou 15 hpi, puis leur expression a été réduite aux stades avancés de l'infection. Ces données sont donc en accord avec les observations de Veena *et al.* (2003) suggérant que l'infection par *Agrobacterium* induit précocement certains gènes de la plante. Cette induction transitoire de l'expression de certains gènes dans les cotylédons de cotonnier pourrait être également la conséquence d'un effet mécanique de l'infiltration d'*Agrobacterium* dans les tissus de la plante. De plus, le test de compatibilité réalisé *in vitro* entre *Agrobacterium* et *Xcm* montrant l'absence d'antagonisme entre les deux bactéries, donne un indicateur - simple- d'une relation *a priori* non concurrentielle entre les deux microorganismes. L'une des explications pourrait résider dans le fait que les deux bactéries diffèrent par leur système de sécrétion des facteurs de virulence (ou d'avirulence) et de pathogénie dans la plante. En effet, *Xcm* injecte ses facteurs *via* le système de sécrétion de type 3 (TTSS) alors qu'*Agrobacterium* utilise le système de type 4 (TFSS) (Alfano et Collmer, 2004). La plante pourrait ainsi réagir de manière différente à ces mécanismes d'injection ; ce qui va dans le sens de la spécificité de la relation cotonnier – *Xcm*, le cotonnier n'étant pas hôte naturel d'*Agrobacterium*.

Généralement, la détection des activités LOX dans les cotylédons «surexprimeurs», surtout dans ceux contenant la construction *p35S-GhLOX1*, s'est révélée positive, quelle que soit l'origine de l'activité LOX, cellules végétales ou *Agrobacterium*. La surexpression du gène *GhLOX1* est toujours associée à une augmentation de l'activité totale LOX ce qui valide la transformation transitoire et suggère fortement que le gène *GhLOX1* code pour une protéine LOX active. Et si le gène *GhLOX1* est induit dans les témoins négatifs représentés par les cotylédons infiltrés par la souche d'*A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D ou les cotylédons agro-transformés (*35S-GFP6*),

son induction diminue rapidement appuyant l'hypothèse que cette induction résulte d'une activité LOX endogène ou de l'agro-infiltration, en accord avec les données discutées par Ditt *et al.* (2001) et Veena *et al.* (2003).

Des expériences antérieures, effectuées par Riker en 1926, indiquaient un effet de la température sur la transformation par les souches d'agrobactérie. Celles-ci sont plus stables aux températures basses (approximativement entre 18 to 20°C). Plus récemment, il a été montré que l'induction du gène *vir* est maximale entre 25 à 27°C (Dillen *et al.*, 1997 ; Turk *et al.*, 1991 ; Jin *et al.*, 1993). Baron et coll. (2001) ont montré que le niveau d'activité de beaucoup de protéine de virulence a été fortement réduit à 28°C comparé à celui observé lors d'expériences conduites à 20°C. Dans ce cadre, j'ai recherché l'effet de la température sur la surexpression du gène *GbLOX1* dans les cotylédons agro-transformés. Les plantes ont été cultivées et agro-transformées à 30°C ou 24°C. La transformation réalisée à la température de 24°C a été plus efficace, bien que celle de 30°C soit optimale pour l'infection par *Xcm*. En effet, l'activité totale LOX était environ 2-3 fois plus forte dans les plantes transformées à 24°C que celle dosée dans les plantes agrotransformées à 30°C. Sur la base de ces données bibliographiques et de nos résultats, nous avons retenu la température de 24°C pour la réalisation de l'expression transitoire et la mesure de l'activité transcriptionnelle du gène *GbLOX1*. C'est uniquement dans le cas de l'utilisation des souches de *Xcm*, que la température de 30°C a été choisie.

L'effet de l'agro-transformation sur le phénotype des cotylédons ne se traduit par aucun symptôme de type RH lorsque le gène *GbLOX1* est surexprimé. Ceci suggère que les acides gras polyinsaturés (AGPIs), C18:2, C18:3 ou C16:3 substrats des LOX, ne sont pas activement métabolisés dans ces plantes transgéniques. Il est probable qu'ils ne soient pas disponibles à des niveaux significatifs dans les cotylédons agro-transformés. Rappelons que cette disponibilité résulte de l'activité d'une lipase concomitamment induite à celle des LOX (Cacas *et al.*, 2005, 2008). L'injection de l'un des substrats de LOX, C18 :2 ou C18 :3, dans les cotylédons agrotransformés a été réalisée afin de vérifier si l'activité enzymatique peut-être corrélée à l'apparition de symptômes de type HR, comme lors de l'étude de l'effet du JA sur l'induction de l'activité LOX (Jalloul, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007). Ce fut effectivement le cas, mais les taches huileuses apparues à la surface des cotylédons ont également été observées sur les cotylédons non agro-transformés, suggérant l'existence d'une activité LOX endogène.

En observant le destin de l'interaction entre les cotylédons des variétés Réba B50 ou Acala44 agro-transformés (*35S-GbLOX1*) puis inoculées avec les races 18 ou 20 de *Xcm*, la cinétique d'apparition des lésions RH chez la variété Réba B50 reste inchangée en comparaison de celle observée dans les cotylédons non agro-transformés inoculés par l'une des deux races. Les



lésions enregistrées dans les cotylédons de la variété Acala44 agro-transformés infectés par la race *Xcm18* s'apparentent aux lésions hypersensibles (taches nécrotiques) qui caractérisent l'interaction incompatible dans le pathosystème cotonnier-*Xanthomonas*. Elles apparaissent cependant avec un certain retard et génère souvent un certain doute quant à leur nature réelle, ce qui pourrait impliquer la participation d'autres composantes, chez la variété Acala 44, dans la régulation de cette mort cellulaire afin d'aboutir sans ambiguïtés au phénotype souhaité.

L'observation de chloroses autour des lésions sur les cotylédons de la variété Acala44 agro-transformés (*35S-GFP6*) employés comme témoin négatif, nous ont conduit à bien distinguer la nature de ces symptômes, résultant de la maladie (chloroses) ou de la résistance (lésions hypersensibles). Afin de s'affranchir définitivement d'un doute sur la nature de ces symptômes, il sera utile, en complément, d'évaluer la perte en eau des tissus et d'effectuer le comptage bactérien des tissus infectés. Dans le cas de la maladie, la perte en eau est plus tardive et le nombre de bactéries augmente significativement, comparés aux niveaux de ces paramètres dans les tissus présentant une RH (Jalloul *et al.*, 2002).

La transformation *Agrobacterium*-intermédiaire est un processus fortement complexe impliquant des déterminants génétiques de la bactérie et de la cellule hôte et déterminantes abiotiques. L'expression différentielle de divers gènes de la plante pendant la transformation *Agrobacterium*-intermédiaire indique une utilisation réussie des machines cellulaires de l'hôte par *Agrobacterium* pour la transformation génétique. Dans l'état actuel de mes travaux sur le cotonnier, nous avons (1) démontré que la surexpression transitoire du gène *GbLOX1* chez le cotonnier est capable, dans certains contextes d'interactions cotonnier/*Xcm*, de déclencher l'apparition de symptômes de type HR et (2) confirmé que le gène *GbLOX1* code pour une LOX active, associé à la régulation de la mort cellulaire au cours de la HR et (3) révélé l'induction précoce et non spécifique de l'expression de certains gènes de défense qui semble être liée à l'agro-infiltration des cotylédons.

**En perspectives** de mes recherches, je propose de réaliser des expériences complémentaires encore nécessaires pour mieux appréhender le mode d'action de cette protéine et achever l'analyse fonctionnelle du gène *GbLOX1*.

Dans un premier temps, il s'agira de vérifier l'origine de l'activité LOX dans les cotylédons transformés. L'idée serait de cloner le gène *GbLOX1* contenant plusieurs introns, d'agro-transformer les cotylédons de la variété Réba B50, puis de doser l'activité LOX dont l'augmentation éventuelle permettrait de s'assurer de son origine végétale. Il serait aussi important

de déterminer la spécificité de cette activité LOX par les techniques de chimie analytique - HPLC-chromatographie chirale.

Il serait, dans un deuxième temps, intéressant d'étudier plus profondément la localisation intracellulaire de la protéine GhLOX1. C'est un point important qui permettrait d'obtenir des données supplémentaires quant à la fonction de ce gène et de renforcer la nature sa spécificité. En effet, les protéines 9-LOX sont généralement cytoplasmiques et celles codées par les gènes *13-LOX*, chloroplastiques (Feussner et Wasternack, 2002). Cette recherche de localisation intracellulaire a été initiée à l'aide d'une fusion entre le gène *GhLOX1* et le gène *GFP*. Les cotylédons ont été infiltrés et transformés par des souches d'*A. tumefaciens* contenant la construction (*35S-GFP6-GhLOX1*) ou (*35S-GhLOX1-GFP6*). En raison d'un certain nombre de problèmes rencontrés au cours ce travail, nous n'avons pas pu détecter la fluorescence liée à la protéine GFP et cette expérience n'a pas abouti. Il sera donc nécessaire de réaliser ces mêmes expériences dans des conditions différentes, notamment sur des cotylédons contenant le gène du gène *GhLOX1* fusionné au gène codant la GFP dans sa partie N-terminale ou C-terminale et placé sous le contrôle du promoteur propre (spécifique) du gène *GhLOX1*.

Par la suite, l'accumulation des protéines *PR1* consécutive à la surexpression du gène *GhLOX1* pourra également être recherchée. Comme déjà rapporté, les transcrits *PR1* s'accumulent globalement de façon plus importante dans des plantes transformées (Zabbai *et al.* 2004). Le suivi de leur accumulation après la surexpression du gène *GhLOX1*, confirmerait l'installation d'une résistance de type RH et tout particulièrement celle de la SAR dont le gène *PR1* est généralement utilisé comme marqueur. Rappelons que chez le cotonnier, la SAR est mise en place lors de l'interaction incompatible entre la variété Réba B50 et la race 18 de *Xcm* (Martinez *et al.*, 2000). Les résultats des expériences proposées peuvent révéler une relation entre le niveau d'expression du transgène et celui du gène *PR* étudié.

Enfin, l'utilisation d'outils génétiques pourrait conduire à atteindre l'objectif initial de ce travail quant à la validation de la fonction du gène *GhLOX1*. Nous mettrons tout d'abord au point la technique d'extinction de ce gène en utilisant la méthode des RNA interférant et pour laquelle des essais préliminaires ont été conduits. Trois constructions sont en effet disponibles puisque trois parties différentes de 500pb chacune ont été clonées à partir de l'ADNc du gène *GhLOX1*, et incorporés dans le vecteur pBIOS (RNAi) sous le contrôle d'un promoteur CsVMV. Une fois la technique mise au point chez le cotonnier pour ce gène, on recherchera alors une modification du phénotype HR, on vérifiera si la transcription du gène *GhLOX1* est altérée, voire éteinte, et nous contrôlerons si l'activité LOX est également affectée. L'ensemble des résultats acquis pourra alors conforter une réelle implication du gène *GhLOX1* dans les mécanismes de

défense du cotonnier vis-à-vis *Xcm*. Puis, nous envisagerons la complémentation de mutants LOX d'*A. thaliana*. En effet, nous disposons d'une lignée altérée dans la fonction d'un gène lipoxygénase de type 9 associée à la RH chez cette plante. Ce mutant pourra être complémenté avec le gène *GbLOX1* puis infecté soit avec *X. c. pv campestris* soit avec *P. syringe*. Des analyses moléculaires, des comptages bactériens et des observations du phénotype de résistance renforceront les données acquises sur la fonction du gène *GbLOX1* dans la RH.

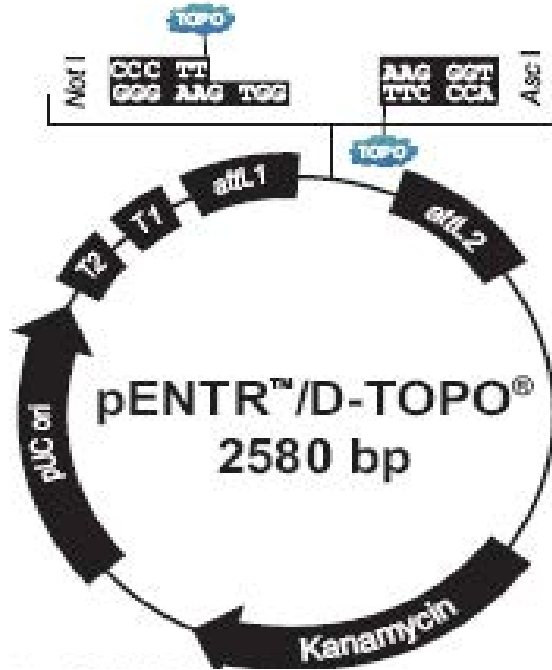


Figure 1.A Le vecteur d'entrée pENTR /D/TOPO

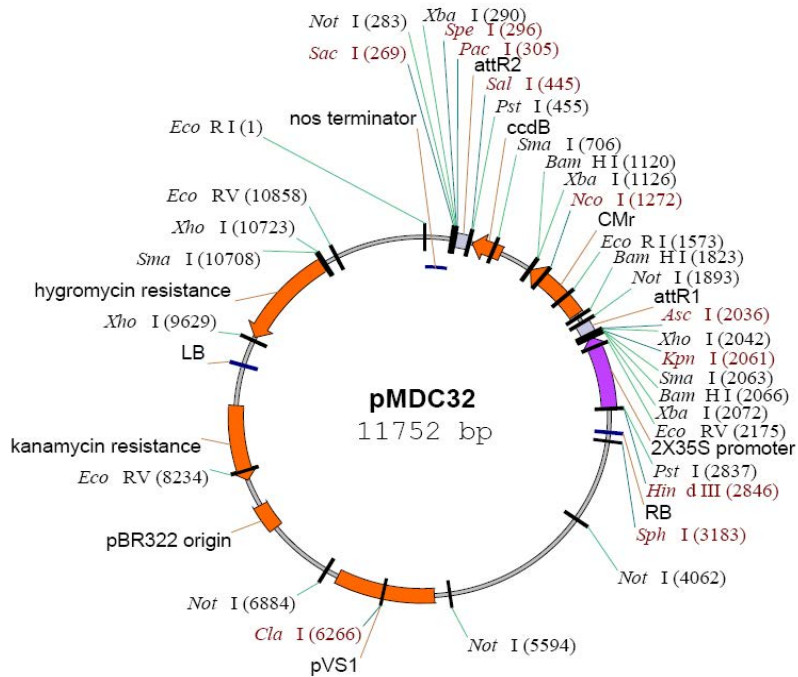


Figure 1.B Le vecteur de destination pDEST, pMDC32

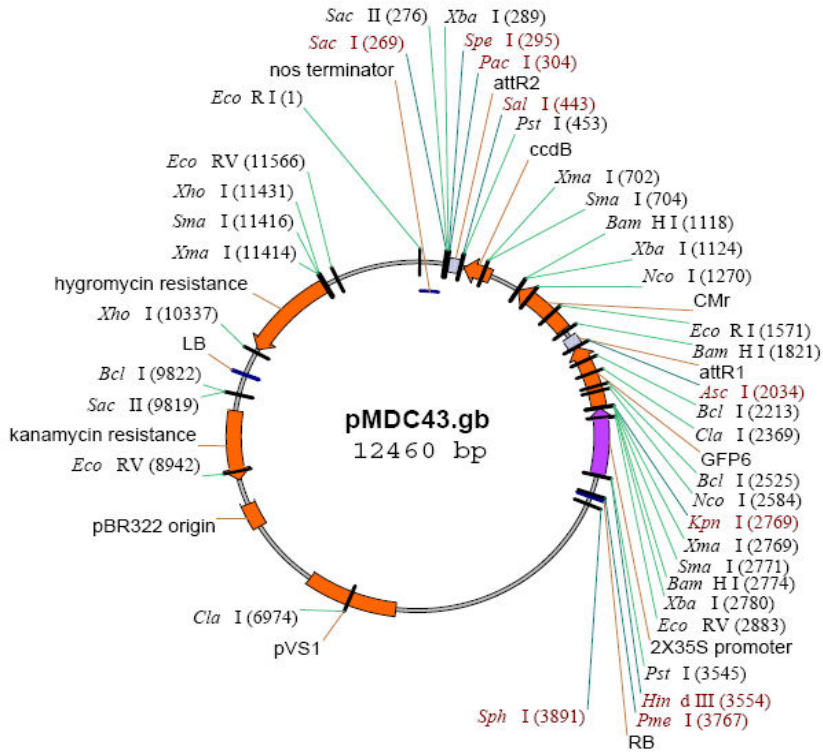


Figure 1.C Le vecteur de destination pDEST, pMDC43

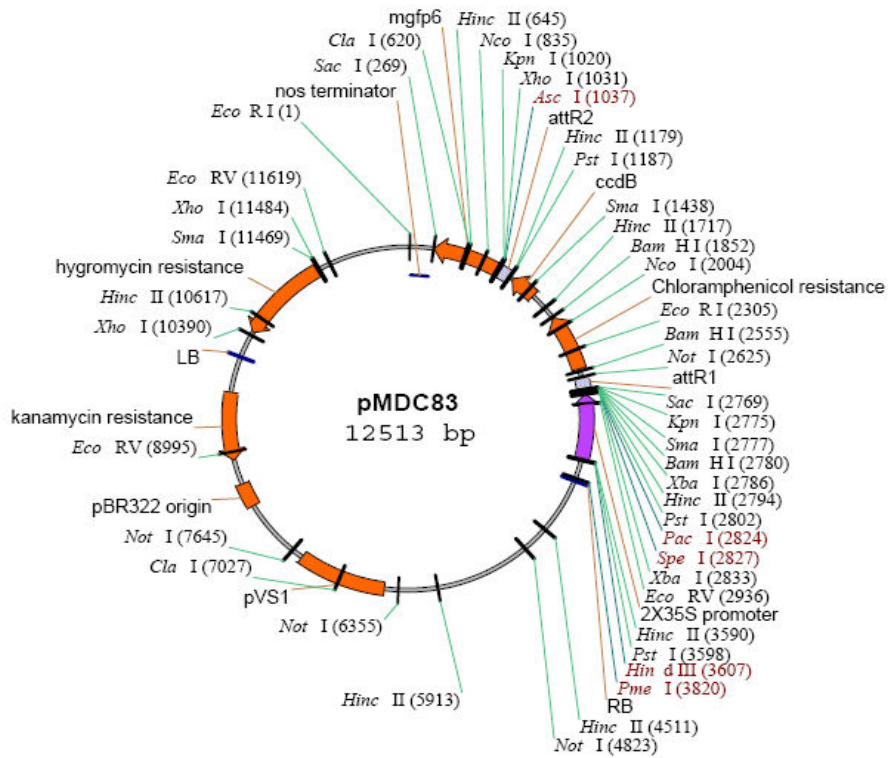
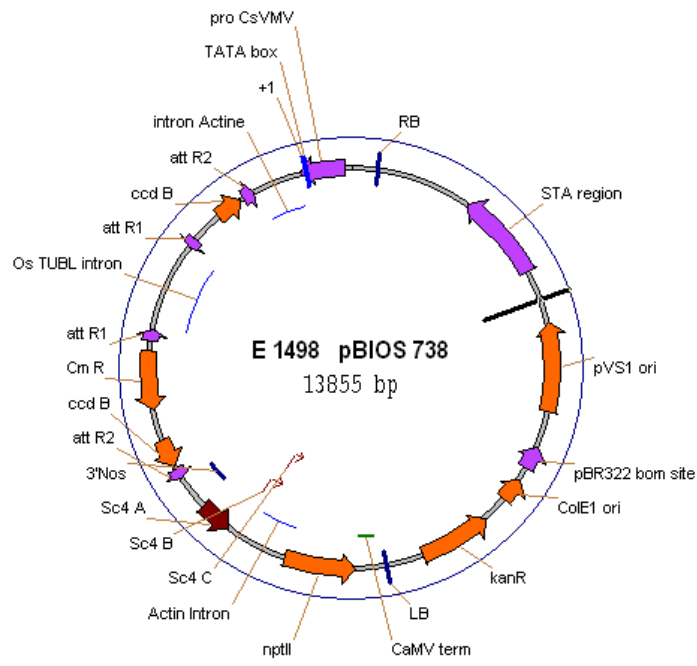


Figure 1.D Le vecteur de destination pDEST, pMDC83



**Figure 1.E Le vecteur de RNAi pBIOS 738**

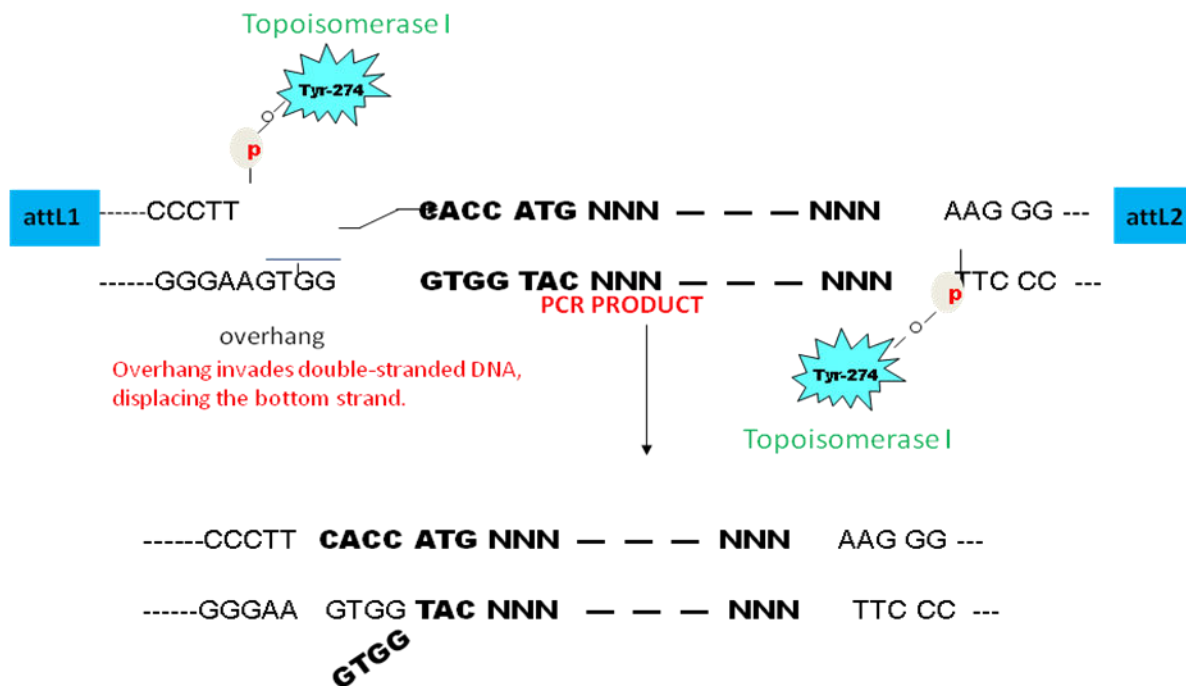


Figure 2. Le clonage directionnel

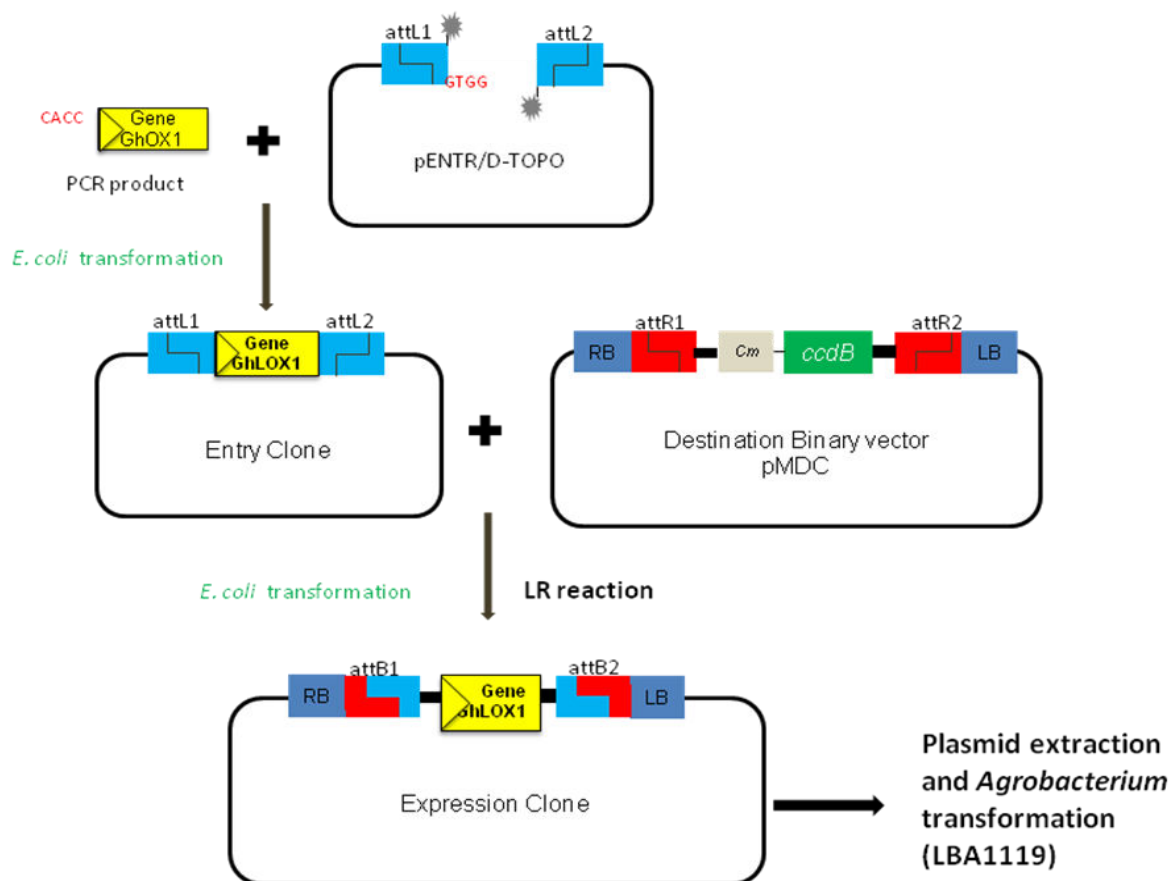


Figure 3: Construction des vecteurs portant le gène *GhLOX1* montrant la réaction LR

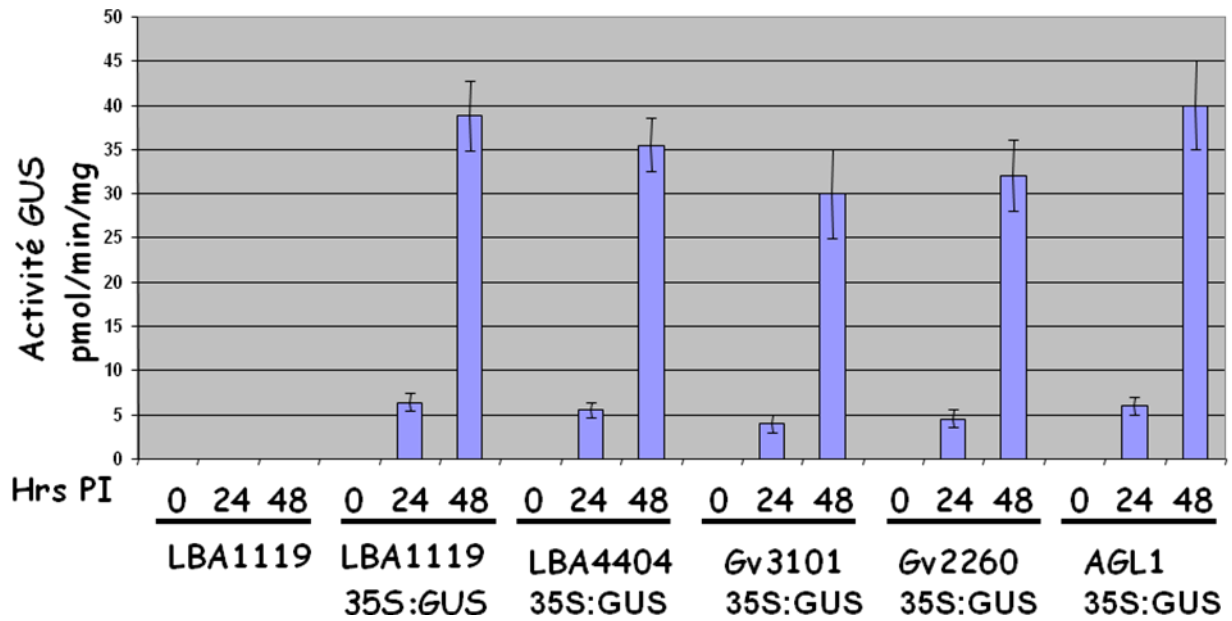


Figure 4 : Dosage quantitatif de l'activité  $\beta$ -glucuronidase dans les cotylédons de *Gossypium hirsutum* contenant le promoteur 35S-GUS intron

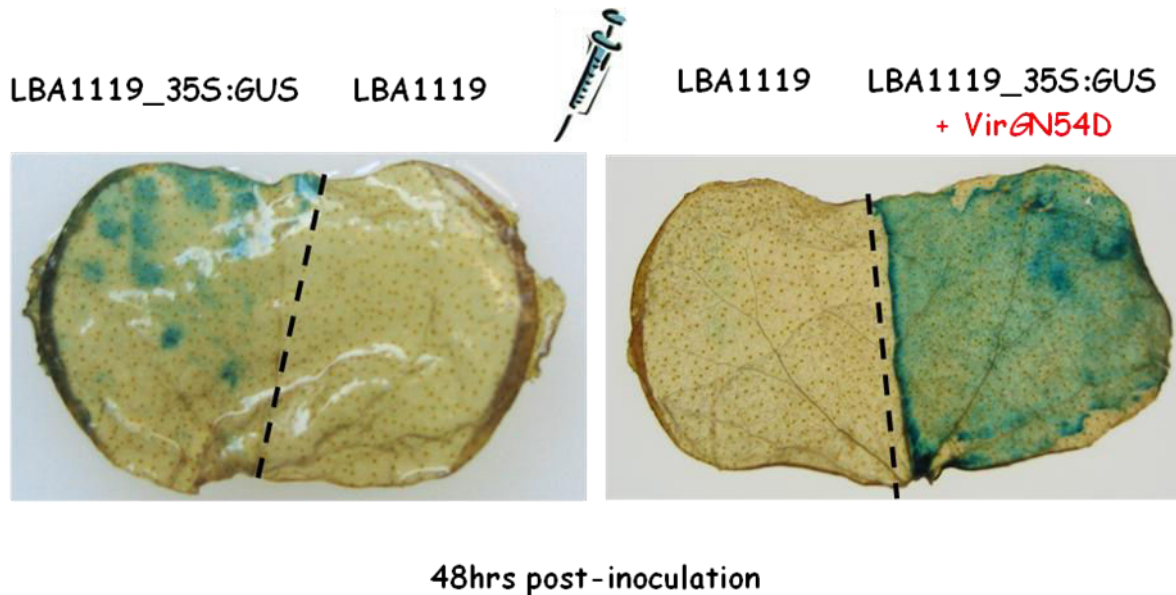


Figure 5: l'analyse histochimique montrant la présence de cristaux indigo au niveau de l'ensemble de la zone infiltrée



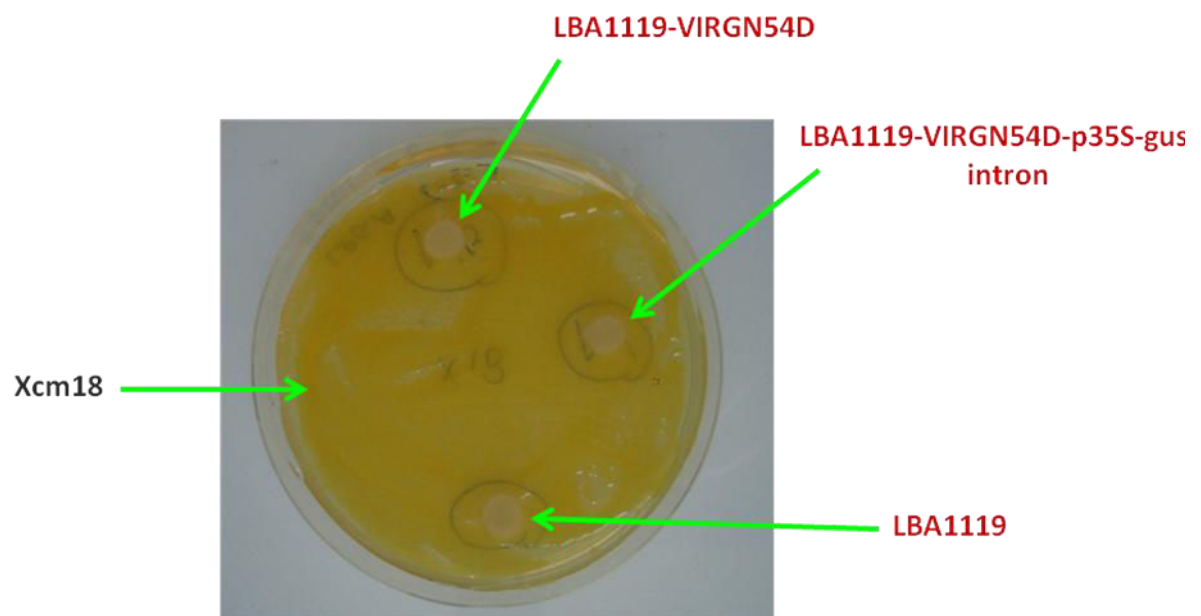


Figure 6: La compatibilité entre trois souches d'*Agrobacterium* LBA1119, LBA1119-VIRGN54D et LBA1119-VIRGN54D-p35S-*gusA*-intron et *Xcm* 18 *in vitro*

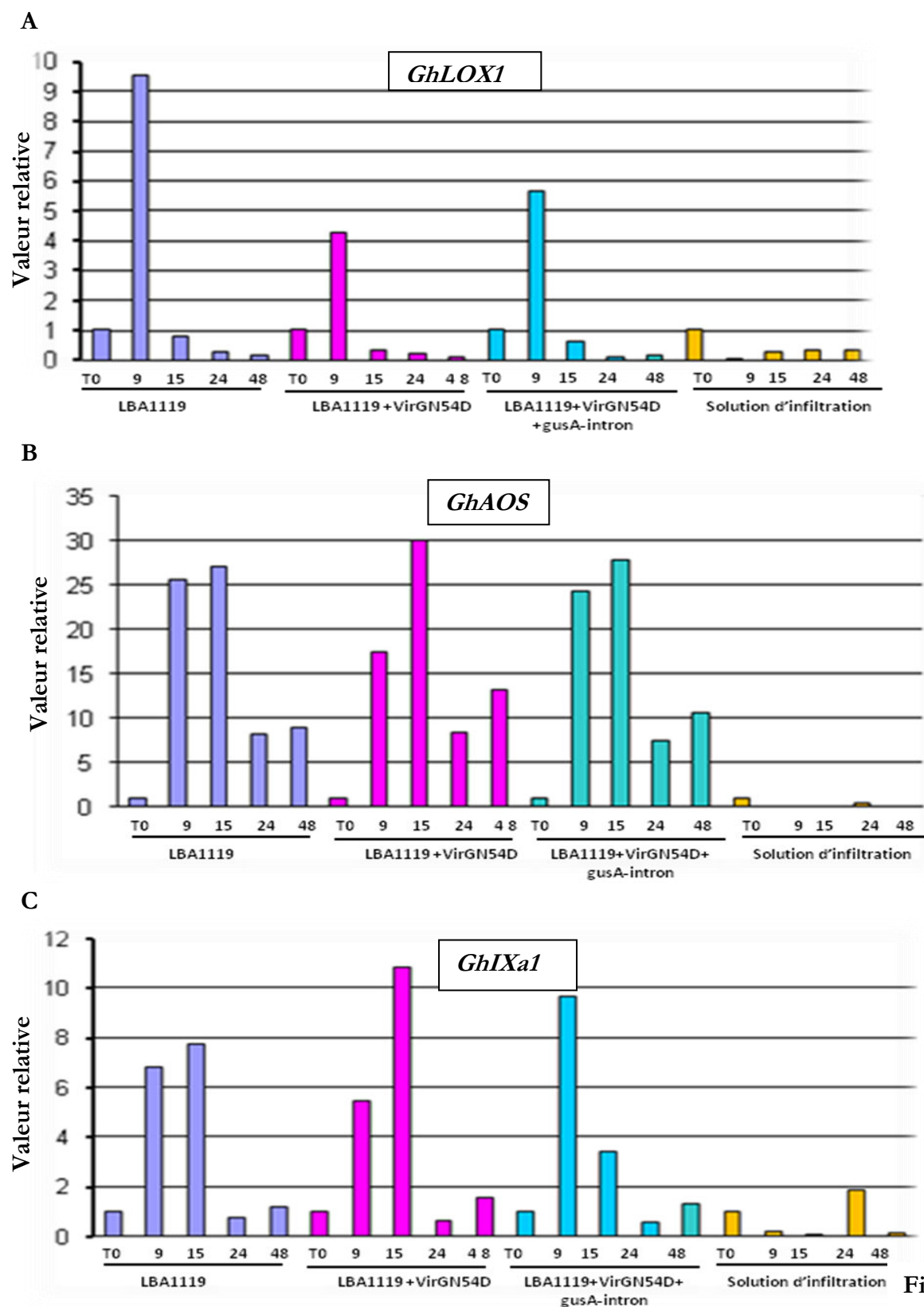
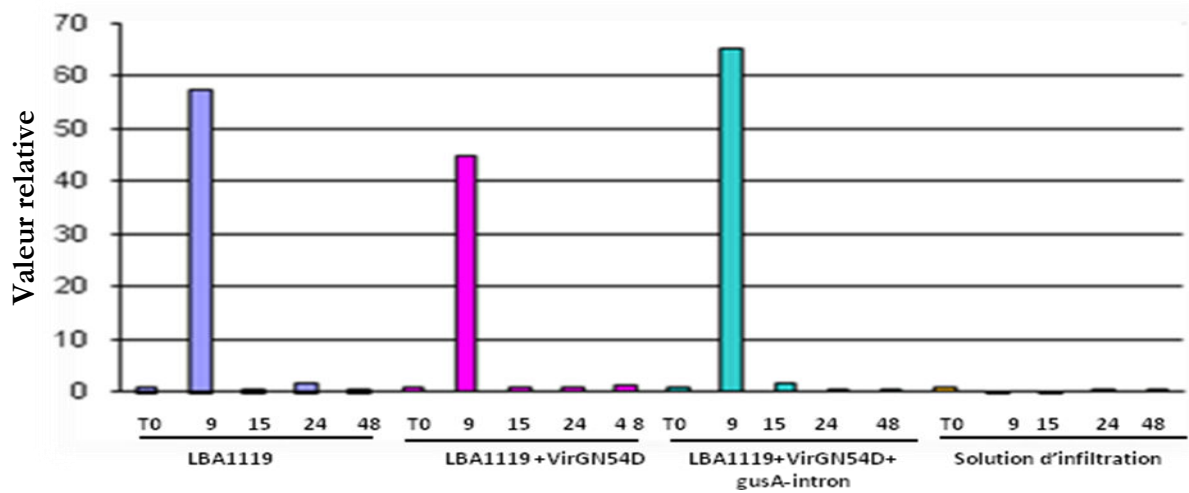
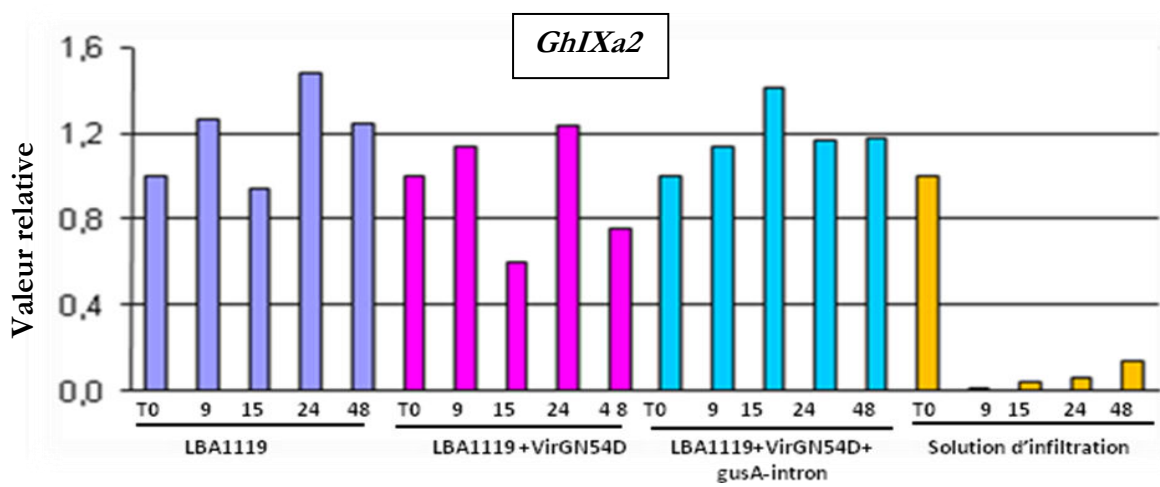


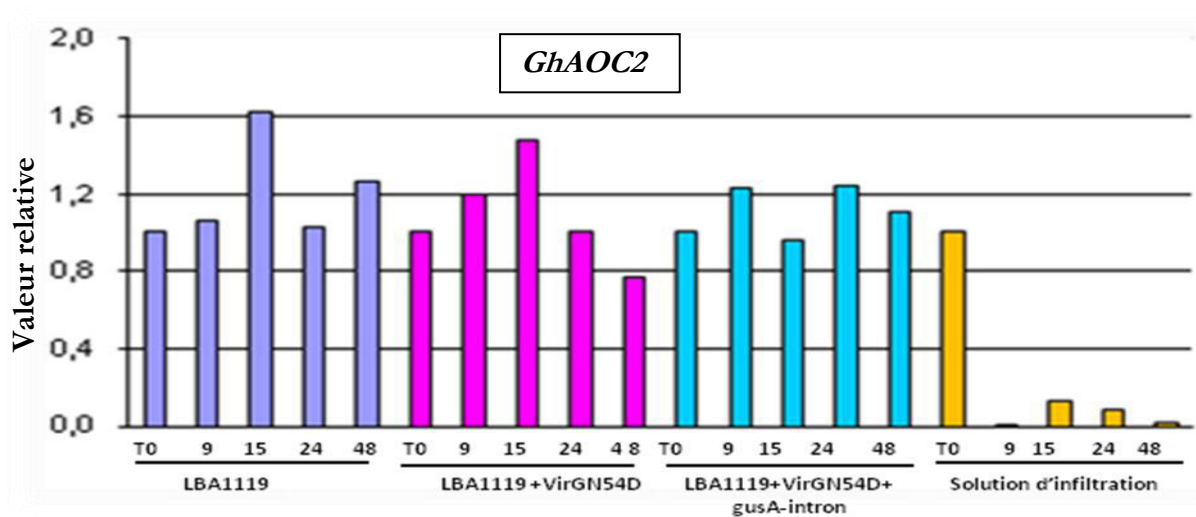
Figure 7D, E, F



E



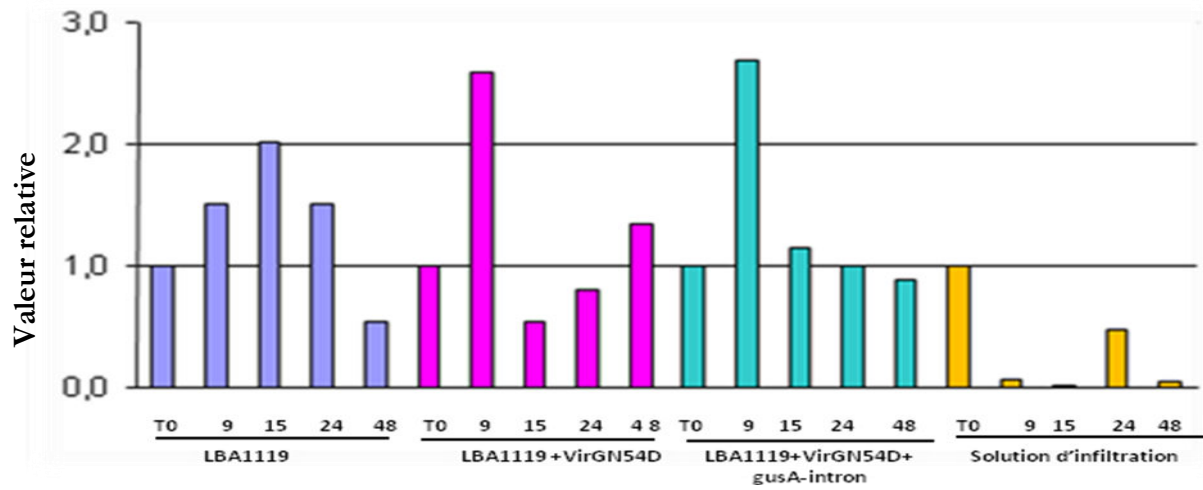
F



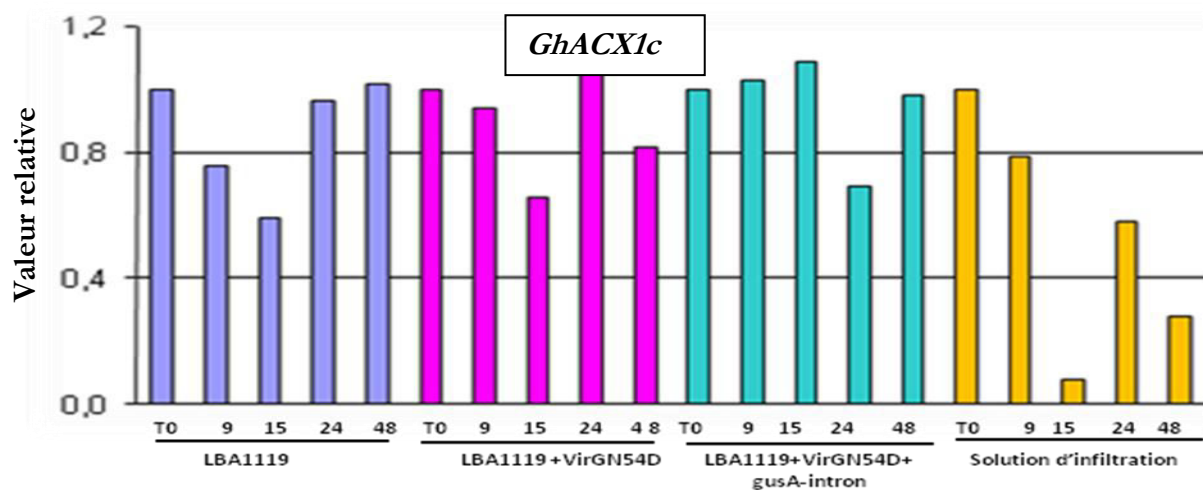
G

*GhACX1a*

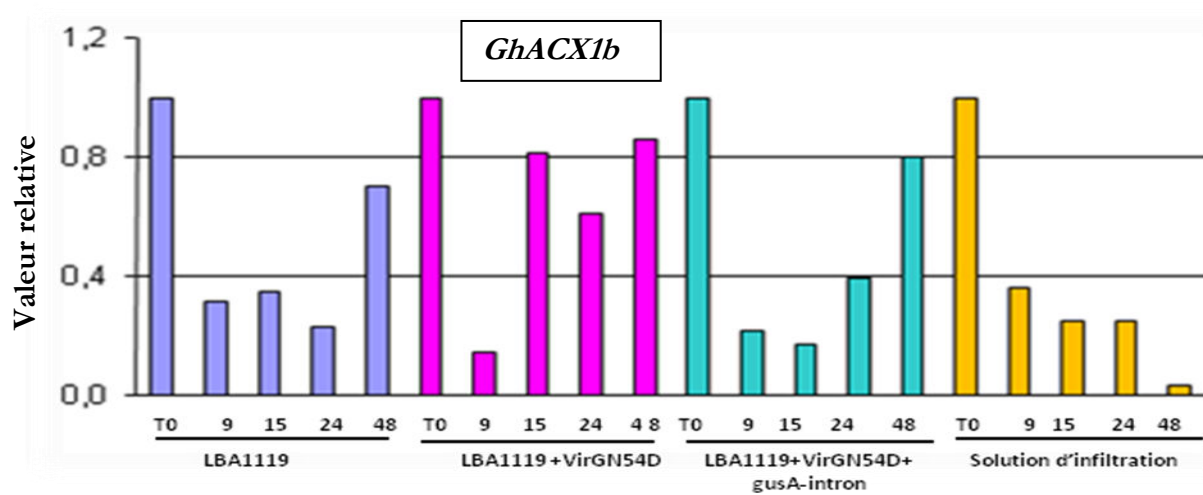
Figure 7G, H, I



H



I



J

*GhIXa3*

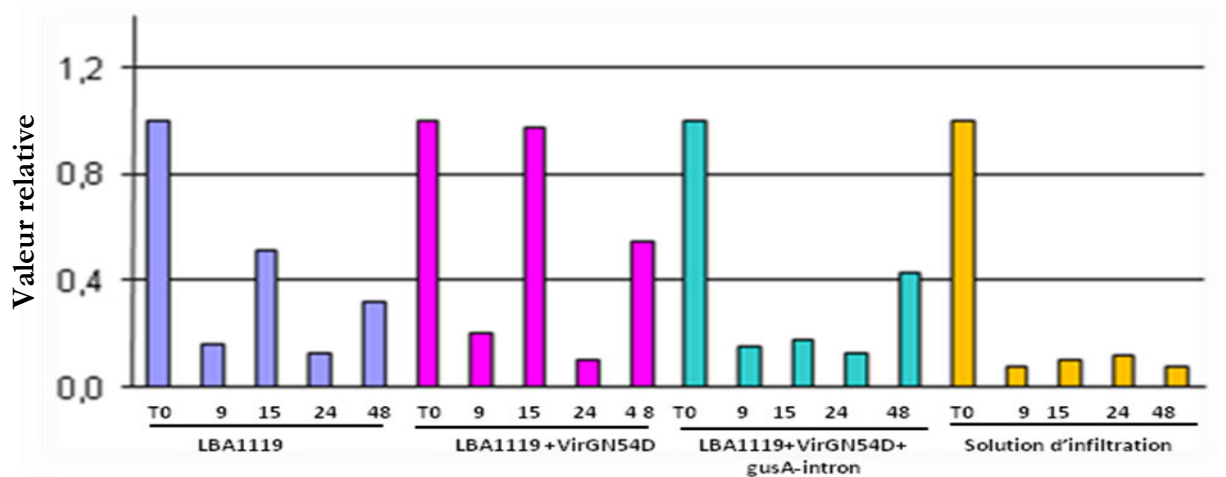


Figure 7: Analyse par qPCR de l'expression de certains gènes de défense (A) *GhLOX1*, (B) *GhAOS*, (C) *GhIXa1*, (D) *JMT1*, (E) *GhIXa2*, (F) *GhAOC2*, (G) *GhACX1a*, (H) *GhACX1c*, (I) *GhACX1b*, (J) *GhIXa3* suite à une inoculation par l'une des trois souches d'*A. tumefaciens* LBA1119, LBA1119-VIRGN54D ou LBA1119-VIRGN54D-p35S-gusA-intron. Les témoins ont été infiltrés avec la solution d'infiltration. Les cinétiques sont constituées de 5 temps de T=0 à T=48h post-inoculation. L'expression des gènes est rapportée au T=0 (égale à 1) et normalisée par l'expression constitutive du gène *GhACT2*.



Figure 8 : Construction utilisée pour surexprimer *Ghlox1* (*p35S-*

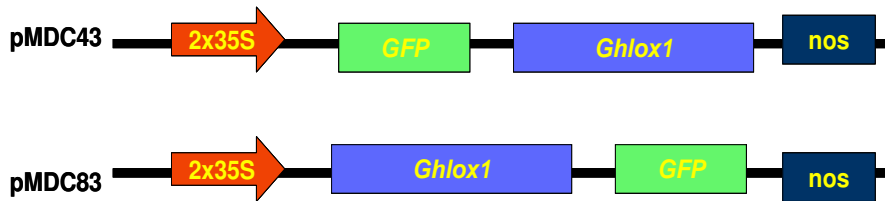
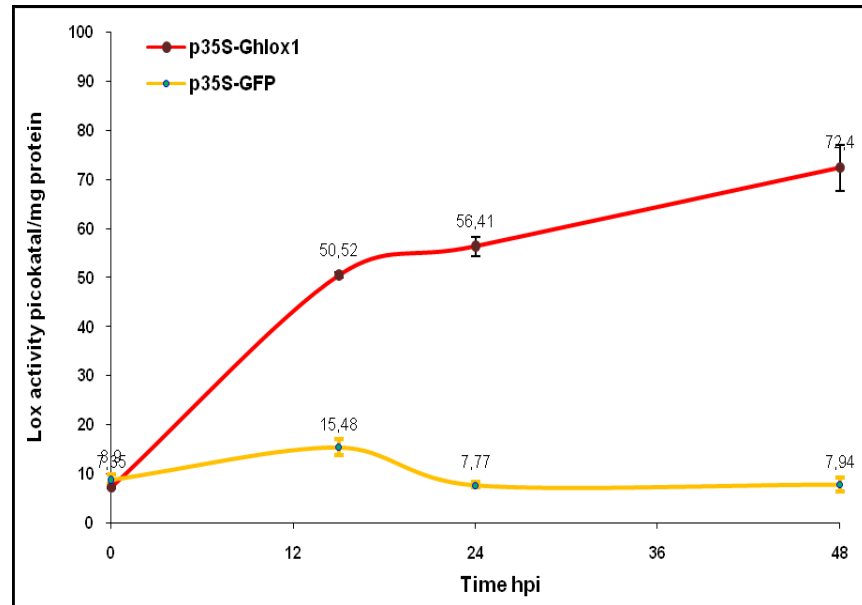


Figure 9 : Constructions utilisées pour l'observation de la localisation intracellulaire de la protéine GhLOX1 (*p35S- Ghlox1-GFP6* et *p35- GFP6- Ghlox1*)



Figure 10 : Construction utilisée comme control négatif (*p35S-*

A



B

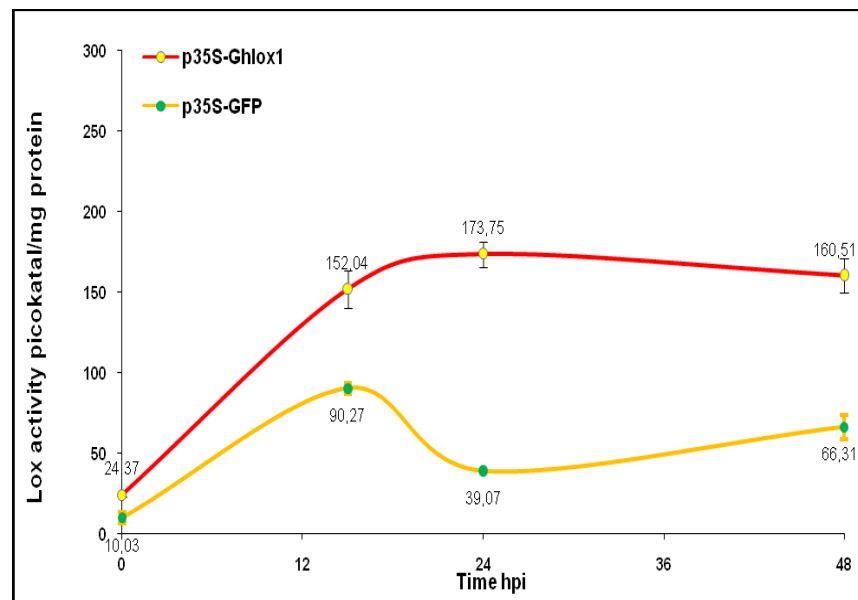


Figure 11: Activités LOX dans des extraits des cotylédons transformés (*p35S-Ghlox1*) en utilisant le substrat lipidique C18:2. Ces activités ont été comparées au témoin négatif : cotylédons transformés (*p35S-GFP6*). La concentration en protéine a été déterminée selon le protocole décrit par Bradford (1976). Ces activités ont été mesurées dans les plantes de cotonnier cultivées à 30°C (A) ou à 24°C (B). Les cinétiques sont constituées de 5 temps de T=0 à T=48h post-inoculation.

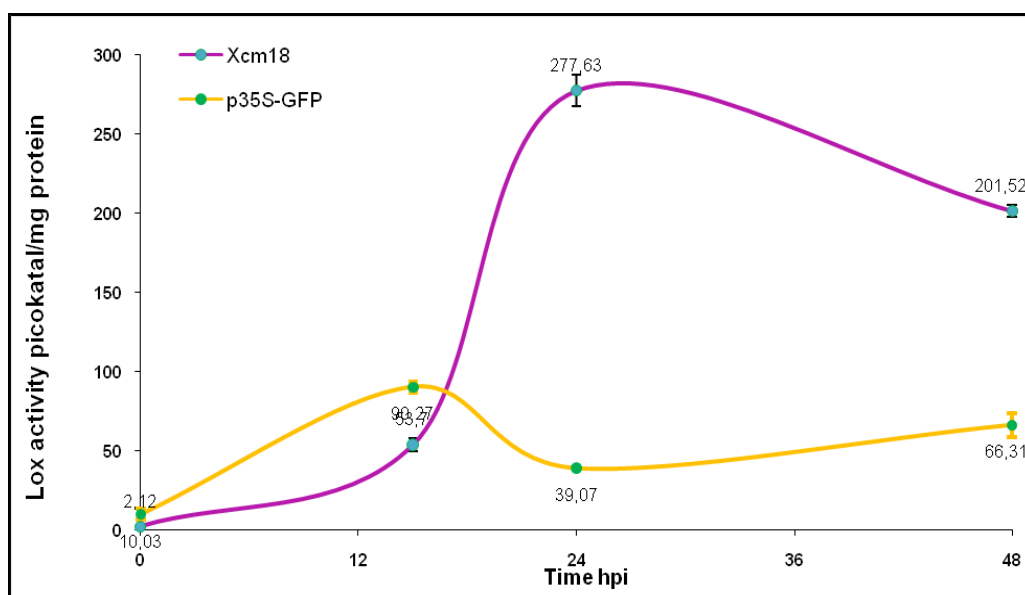


Figure 12: Activités LOX dans des extraits des cotylédons infectés par la souche avirulente *Xcm 18* en utilisant le substrat lipidique C18:2. Ces activités ont été comparées au témoin négatif : cotylédons transformés (*p35S-GFP6*). La concentration en protéine a été déterminée selon le protocole décrit par Bradford (1976). Les cinétiques sont constituées de 5 temps de T=0 à T=48h post-inoculation. Ces activités ont été mesurées dans les plantes de cotonnier cultivées à 30°C.

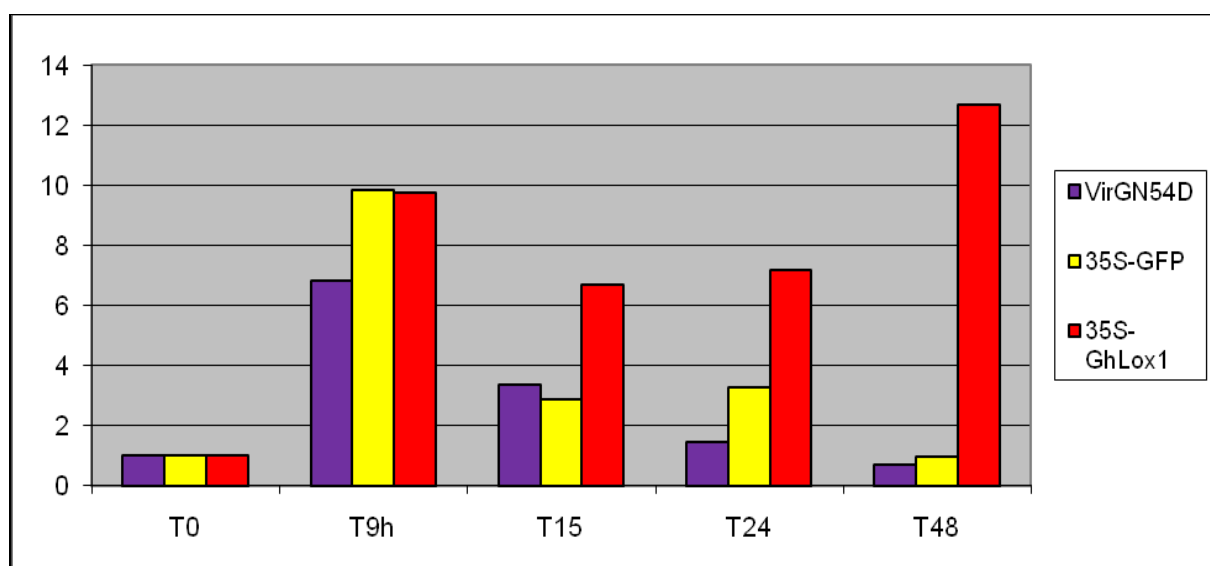


Figure 13: Analyse par qPCR de l'expression du gène *GhLOX1* dans des cotylédons transformés (*35S-GhLOX1*), comparée aux témoins négatifs : cotylédons transformés (*35S-GFP6*) et en réponse à l'infection par *A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D. Les cinétiques sont constituées de 5 temps de T=0 à T=48h post-inoculation. L'expression du gène est rapportée au T=0 (égale à 1) et normalisée par l'expression constitutive du gène *GhACT2*.





Figure 14 : Première analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés destinés à la surexpression (*p35S-Ghlox1*) comparée aux témoins négatifs

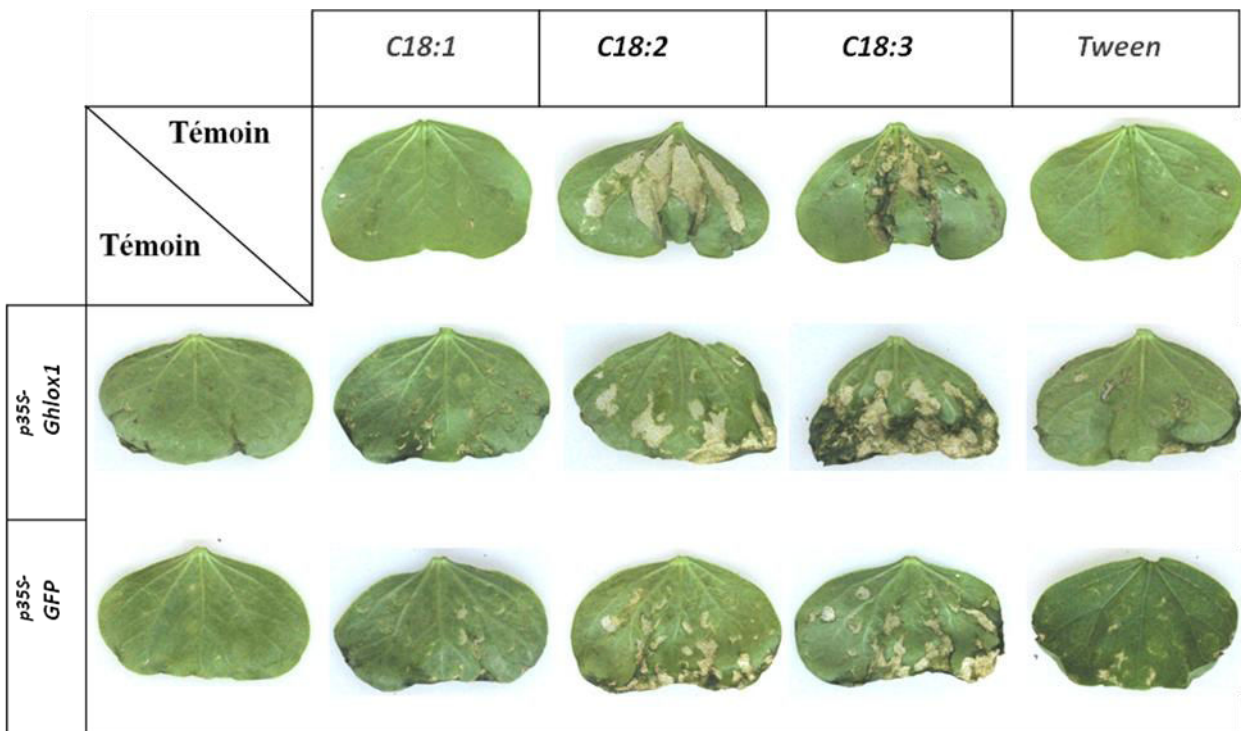


Figure 15 : Deuxième analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés destinés à la surexpression (*p35S-Ghlox1*) comparée aux témoins négatifs













<i>35S-GhLOX1</i>		Témoin	Xcm18	Xcm20
Acala44	2jpi			
	5jpi			
B2B3	2jpi			
	5jpi			

Figure 16 : Troisième analyse phénotypique sur les cotylédons agrotransformés destinés à la surexpression (*p35S-Ghlox1*)













<i>35S-GFP6</i>		Témoin	Xcm18	Xcm20
Acala44	2jpi			
	5jpi			
B2B3	2jpi			
	5jpi			

Figure 17 : Troisième analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés (*p35S-GFP6*) (contrôle négatif)

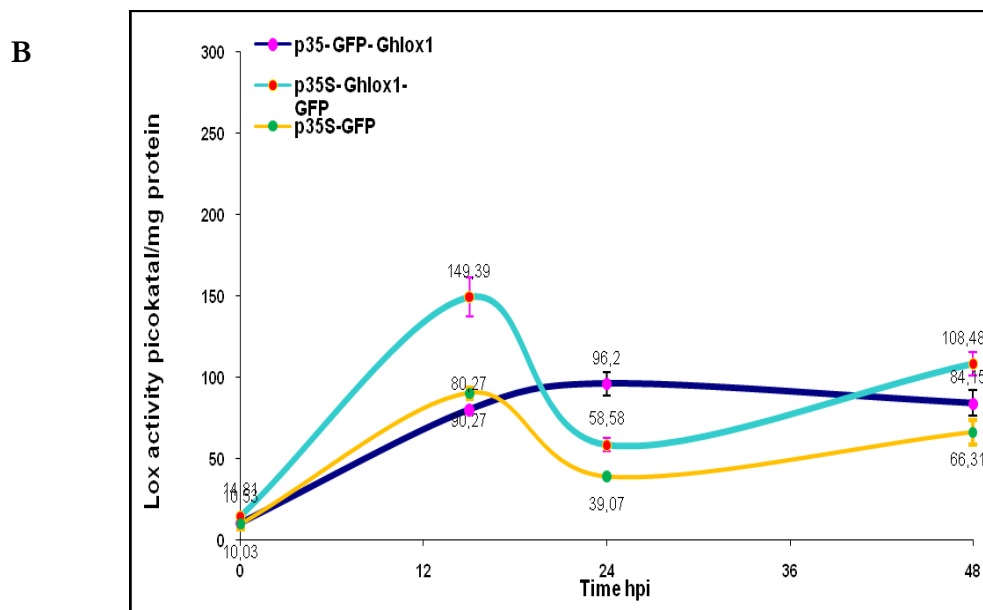
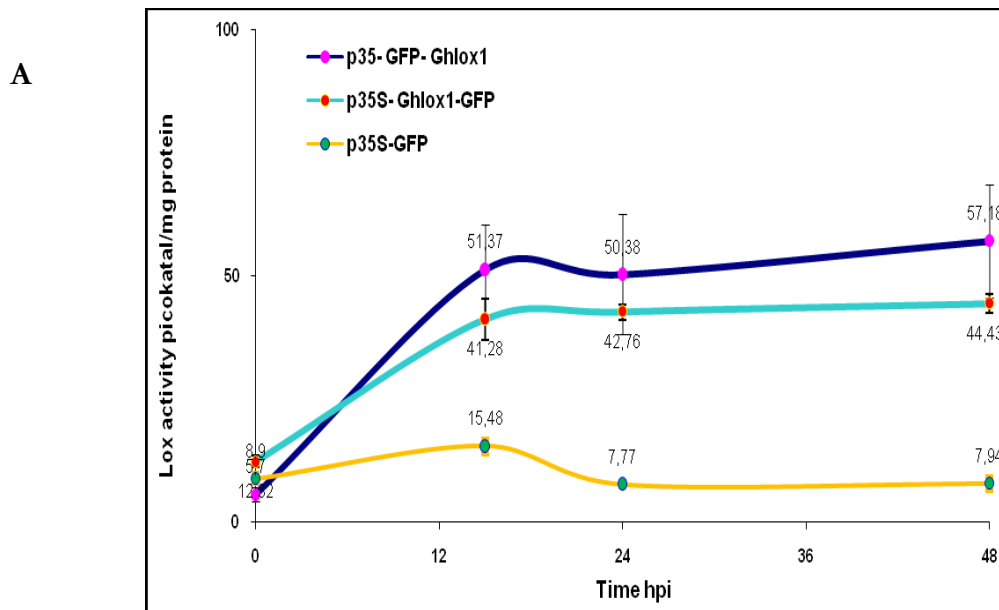


Figure 18: Activités LOX dans des extraits des cotylédons transformés (*p35S-GFP6-Ghlox1*) et (*p35S-Ghlox1-GFP6*) en utilisant le substrat lipidique C18:2. Ces activités ont été comparées au témoin négatif (des cotylédons transformés (*p35S-GFP6*)). La concentration en protéine a été déterminée selon le protocole décrit par Bradford (1976). Ces activités ont été mesurées dans les plantes de cotonnier cultivées à 30°C (A) ou à 24°C (B). Les cinétiques sont constituées de 5 temps de T=0 à T=48h post-

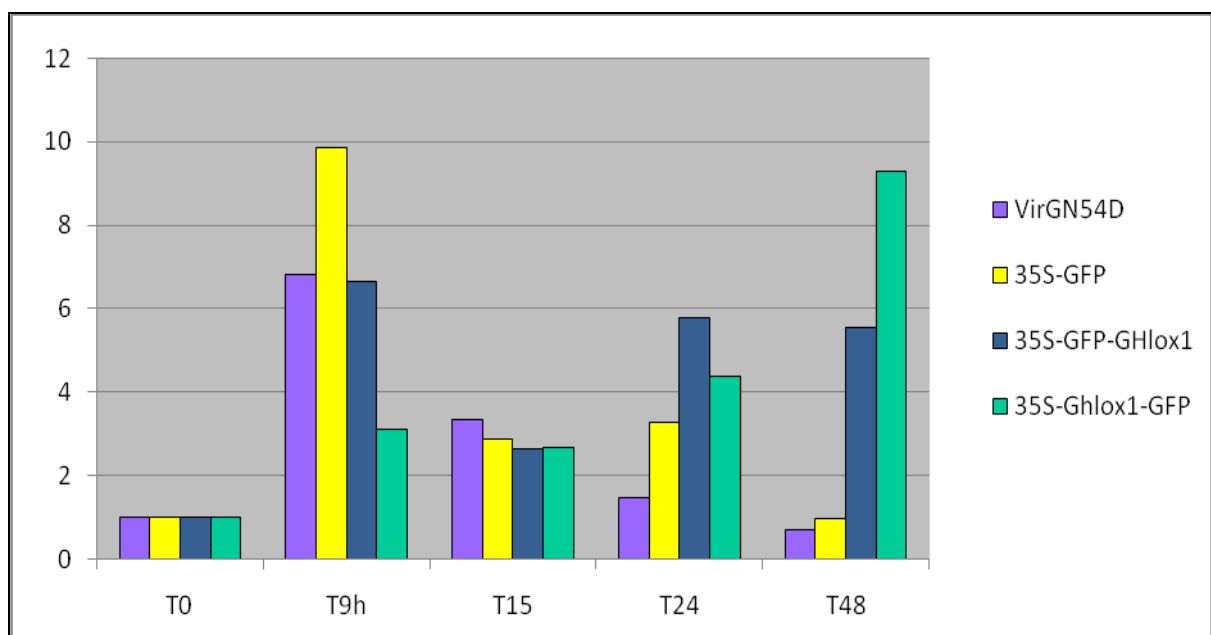


Figure 19: Analyse par qPCR de l'expression du gène *GhLOX1* dans des cotylédons transformés (*p35S-GFP6-Ghlox1*) et (*p35S-Ghlox1-GFP6*) comparée aux témoins négatifs (des cotylédons transformés (*35S-GFP6*) et en réponse à l'infection par *A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D). Les cinétiques sont constituées de 5 temps de T=0 à T=48h post-inoculation. L'expression du gène est rapportée au T=0 (égale à 1) et normalisée par l'expression constitutive du gène *GhACT2*.



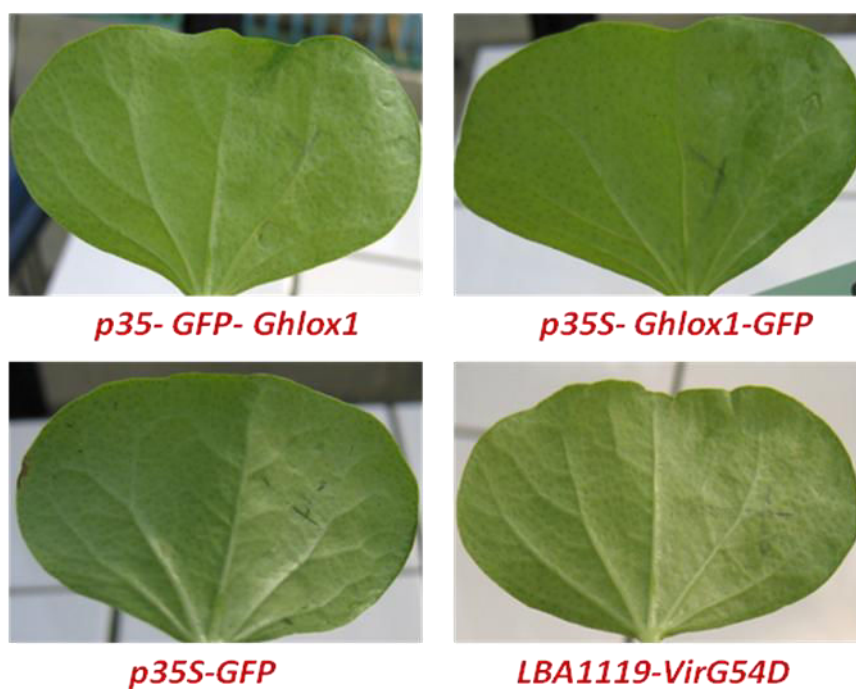


Figure 20 : Première analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés (*p35S- Ghlox1-GFP6* et *p35-GFP6- Ghlox1*) comparée aux témoins négatifs

		C18:1	C18:2	C18:3	Tween
Témoin	Témoin				
	<i>p35S-GFP-Ghlox1</i>				
<i>p35S-Ghlox1-GFP</i>					
<i>p35S-GFP</i>					

Figure 21 : Deuxième analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés (*p35S- Ghlox1-GFP6* et *p35-GFP6- Ghlox1*) comparée aux témoins négatifs













<i>35S-GhLOX1-GFP6</i>		Témoin	Xcm18	Xcm20
Acala44	2jpi			
	5jpi			
B2B3	2jpi			
	5jpi			

Figure 22 : Troisième analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés (*p35S-Ghlox1-GFP6*)










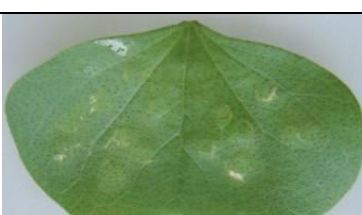


<i>35S-GFP6-GhLOX1</i>		Témoin	Xcm18	Xcm20
Acala44	2jpi			
	5jpi			
B2B3	2jpi			
	5jpi			

Figure 23 : Troisième analyse phénotypique des cotylédons agrotransformés (*p35S-GFP6-Ghlox1*)



N°	Souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Utilisation
1	LBA1119	Transformation transitoire Effet d' <i>Agrobacterium</i> sur la défense
2	LBA119-p35S- <i>gusA</i> -intron	Transformation transitoire
3	LBA4404- p35S- <i>gusA</i> -intron	Transformation transitoire
4	GV3101-p35S- <i>gusA</i> -intron	Transformation transitoire
5	AGL1-p35S- <i>gusA</i> -intron	Transformation transitoire
6	C58C1-p35S- <i>gusA</i> -intron	Transformation transitoire
7	LBA1119-pACT- <i>gusA</i> -intron #1	Transformation transitoire
8	LBA1119-pACT- <i>gusA</i> -intron #2	Transformation transitoire
9	LBA1119-pACT- <i>gusA</i> -intron #3	Transformation transitoire
10	LBA1119-pACT- <i>gusA</i> -intron /VIRGN54D #1	Transformation transitoire
11	LBA1119-pACT- <i>gusA</i> -intron /VIRGN54D #2	Transformation transitoire
12	LBA1119-pACT- <i>gusA</i> -intron /VIRGN54D #3	Transformation transitoire
13	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron	Transformation transitoire Effet d' <i>Agrobacterium</i> sur la défense
14	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p1Mg1 #1	Transformation transitoire
15	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p1Mg1 #2	Transformation transitoire
16	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p1Tz3 #1	Transformation transitoire
17	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p1Tz3 #2	Transformation transitoire
18	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p1Tz3 #3	Transformation transitoire
19	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p19 #1	Transformation transitoire
20	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p19 #2	Transformation transitoire
21	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /p19 #3	Transformation transitoire
22	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p1Mg1+VIRG) #1	Transformation transitoire
23	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p1Mg1+VIRG) #2	Transformation transitoire
24	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p1Mg1+VIRG) #3	Transformation transitoire
25	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p1Tz1+VIRG) #1	Transformation transitoire
26	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p1Tz1+VIRG) #2	Transformation transitoire
27	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p1Tz1+VIRG) #3	Transformation transitoire
28	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p19+VIRG) #1	Transformation transitoire
29	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p19+VIRG) #2	Transformation transitoire
30	LBA1119-VIRGN54D-p35S- <i>gusA</i> -intron /(p19+VIRG) #3	Transformation transitoire
31	LBA1119-VIRGN54D	Effet d' <i>Agrobacterium</i> sur la défense Expérience de la fonction biologique de <i>Ghlox1</i> .

Tableau 1: Différentes souches d'*A. tumefaciens* utilisées

Nom du gène	Nom des Oligonucléotide	Séquence des Oligonucléotide
<i>GbLOX1</i>	<b>CA-<i>Ghlox1F</i></b>	5'-CACCAAAATGCTGAGCCATTTGCTCCACG-3'
<i>GbLOX1</i>	<b>CA-<i>Ghlox1R</i></b>	5'-TCAGATTGAGACACTGTTTGG-3'
<i>GbLOX1</i>	<b>CA-<i>Ghlox1ΔStopR</i></b>	5'-GATTGAGACACTGTTTGG-3'
<i>GbLOX1</i>	<b>CA-<i>Ghlox1R500</i></b>	5'-GTCTTGTTAGTGAAGAAAACG-3'
<i>GbLOX1</i>	<b>CA-<i>Ghlox1F1299</i></b>	5'-CACCAAAATATTTGGATCATCATGATTCAC-3'
<i>GbLOX1</i>	<b>CA-<i>Ghlox1R1799</i></b>	5'-CTCTTGTAATCACTGATGAC-3'
<i>GbLOX1</i>	<b>CA-<i>Ghlox1F2098</i></b>	5'-CACCAAAAGAGTTGATCGATTCTTGC-3'

**Tableau 2: Oligonucléotides utilisés pour les différents clonages au cours des expériences sur l'étude de la fonction du gène *GhLOX1*.**

N° d'accession	Nom du gène	Séquences des oligonucléotides
TA24678	<i>GbERF1a1</i>	5'-GGAGCCGTCTTCGTCTTC-3'
		5'-GTCTAACCCAGCGTGAACC-3'
TA23744	<i>GbERF1a2</i>	5'-GGAACCCGACCCAGTTAGG-3'
		5'-TCTGAACCCGAGGACGAAG-3'
TA26653	<i>GbERF1a3</i>	5'-ACAGGATCGGCAACAATGAG-3'
		5'-CGAAGGTGTATTATACGAAGAAGG-3'
DQ861284	<i>GbLOX1</i>	5'-GCTTGACCAGGCACCTTC-3'
		5'-GCAAACCAAATCTCCAGTCC-3'
AY305724	<i>GbACT2</i>	5'-CAGCACCTTCCAGCAGATG-3'
		5'-CACTTGACACGGCACACC-3'
TA21823_3635	<i>GbAOS</i>	5'-AGAGAGCGGAGGAGTTTG-3'
		5'-GACATCAACACCACGAAATC-3'
TA21729_3635	<i>GbAOC2</i>	5'-AGGCTATTCCATCTGATAACTC-3'
		5'-ATCCGTTTCTCCAAATCTCC-3'
TA22885_3635	<i>GbACX1a</i>	5'-AAACATCTCGGTGACTTTG-3'
		5'-AGAACAGAGCCAAGGTAG-3'
TA27572_3635	<i>GbACX1b</i>	5'-CCCAGGTCCGTCCAAATG-3'
		5'-GCCGAACATATTCAAGGTAAC-3'
DW243199	<i>GbACX1c</i>	ATGGGACGAGCAGAACAC
		TCAAGCAAATCAGGCGAAAG
TA34049_3635	<i>GbJMT1a</i>	TCAAGCAAATCAGGCGAAAG
		AGAGGAACTGGTGGATGGAG

**Tableau 3: Oligonucléotides utilisés en QPCR pour les gènes *GbLOX1*, *GbAOS*, *GbAOC2*, *GbACX1a*, *GbACX1b*, *GbJMT1a*, *GbACX1c*, *GbERF1a1*, *GbACX1b*, *GbACX1c* et *GbACT2b* au cours des expériences de l'effet d'*Agrobacterium* sur certaines réponses de défense du cotonnier**

**CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

L'interaction entre les races de *Xcm*, agent de la brûlure bactérienne, et *G. hirsutum* relève du modèle conventionnel de la relation gène pour gène (Delannoy *et al.*, 2005 ; Gabriel *et al.*, 1986). La mise au point d'une gamme différentielle de cotonnier de l'espèce *G. hirsutum* avec différents gènes R majeurs a permis l'identification de 22 races de l'agent pathogène. Huit gènes d'avirulence (*avr*) ont été clonés et l'analyse génétique des interactions *Xcm* - cotonnier montre que chaque gène *avr* interagit spécifiquement avec le gène R correspondant chez la plante (De Feyter *et al.*, 1993, 1998).

Notre laboratoire s'intéresse depuis près de 15 ans à l'étude des interactions entre le cultivar Réba B50 de *G. hirsutum*, porteur des gènes R  $B_2B_3$ , et les génotypes bactériens *Xcm* 18 (race avirulente) et *Xcm* 20 (race virulente). Dans ce cadre, différents mécanismes intervenant durant les 24 premières heures de l'installation de la RH ont été élucidés (Champion *et al.*, 2009 ; Dai *et al.*, 1996 ; Delannoy *et al.*, 2003, 2006 ; Jalloul, 2002 ; Jalloul *et al.*, 2002 ; Martinez *et al.*, 1998 ; Martinez *et al.*, 2000 ; Voloudakis *et al.*, 2006). Parmi eux, la peroxydation des lipides membranaires catalysée par une LOX de type 9, la GhLOX1, est d'importance cruciale (Jalloul, 2002 ; Jalloul *et al.*, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007) car son action est étroitement associée à l'exécution de la mort cellulaire de type hypersensible. Bien qu'intervenant également au cours de l'interaction compatible, sa fonction biologique dans l'interaction incompatible apparaît hautement spécifique, bien que non génétiquement démontrée. En effet, l'accumulation massive des 9-hydroperoxydes est concomitante à la perte en eau des tissus infectés, à l'accroissement de l'activité catalytique de la protéine et à l'apparition du phénotype HR. Elle suit également la transcription du gène *GhLOX1*, dont l'analyse de la séquence a révélé qu'il code une 9-LOX (Marmey *et al.*, 2007). Un faisceau d'éléments qui renforce l'idée selon laquelle le gène *GhLOX1* joue un rôle majeur dans les réponses adaptatives du cotonnier à *Xcm*. Cette hypothèse s'applique également aux plantes en général dont les gènes 9-LOX semblent être très sollicités en cas de stress biotiques, voire abiotiques (Göebel *et al.*, 2001, 2002 ; Rustérucci *et al.*, 1999 ; Rancé *et al.*, 1998 ; Jalloul *et al.*, 2003 ; Montillet *et al.*, 2002 ; Cacas *et al.*, 2005). Dans ce contexte, le sujet de

thèse qui m'a été proposé s'inscrit dans la compréhension de la fonction de ce gène dans l'interaction *Gossypium - Xanthomonas*.

**Les travaux de recherche de la première partie de ma thèse** ont eu pour objectif de répondre à la question de la variation possible de la réponse LOX en fonction du fond génétique du cotonnier. Bien que nous ne disposions pas de l'ensemble de la gamme d'hôte ayant permis de caractériser la relation gène à gène (Follin *et al.*, 1988 ; Gabriel *et al.*, 1986), plusieurs interactions gène R – gène *avr* ont été retenues pour suivre l'activité LOX, la transcription du gène *GhLOX1* et le phénotype de la résistance exprimée (Sayegh-Alhamdia *et al.*, 2008). Des lignées isogéniques et des génotypes de cotonnier contenant deux combinaisons différentes des gènes R, B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>, ou B<sub>2</sub>b<sub>6</sub>, ou un seul gène R, B<sub>2</sub>, b<sub>6</sub>, ou B<sub>12</sub>, conférant une résistance à *Xcm* ont été infectés par l'une des trois races 1, 18 ou 20. La race 20 de *Xcm* est connue pour être virulente pour tous les génotypes de cotonnier, tandis que les races 1 et 18 induisent la RH plus ou moins prononcée (Delannoy *et al.*, 2005 ; Follin *et al.*, 1988). Il est remarquable que deux types de symptômes de la RH aient été observés. Le type 1 qui se caractérise par des zones sèches associées aux lésions, au blanchiment des tissus et à la pigmentation brune des nervures est associé aux génotypes Réba B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>, Empire B<sub>2</sub>b<sub>6</sub> et S295 B<sub>212</sub>. Le type 2 qui a révélé des lésions sèches entourées de tissus chlorotiques a été observé sur les génotypes AcB<sub>2</sub> et Acb<sub>6</sub>. L'activité LOX et la transcription du gène *GhLOX1* mesurées dans les différents génotypes testés sont à mettre en parallèle à l'apparition de la RH. La rapidité et l'intensité de l'augmentation de leurs niveaux, sont significatives et précèdent de quelques heures l'apparition irréversible des symptômes de la RH. Elles peuvent dépendre du fond génétique qui héberge le gène R, bien que d'autres sources de résistances mériteraient encore d'être évaluées. Ainsi, le gène *GhLOX1* apparaît comme un gène primordial à la mise en place des mécanismes de défense spécifiques et peut être considéré comme un marqueur de choix de la résistance du cotonnier à *Xcm*.

L'existence des génomes A et D dans le cotonnier peut avoir des conséquences compliquant les interactions entre cette plante et ses parasites, dont *Xcm*. La cartographie moléculaire a indiqué que la base génétique de cette interaction cotonnier/*Xcm* est plus complexe que les données classiques. Wright *et al.*, (1996) ont montré que l'allèle de gène récessif (b<sub>6</sub>) était une remarquable exception à la dominance génétique de la plupart des allèles de résistance. Ces auteurs ont également révélé l'effet du gène R B<sub>3</sub> sur la résistance par la capacité de cet allèle à réduire la sévérité de la maladie provoquée par *Xcm*. Malheureusement, dans notre travail, nous n'avons pas pu vérifier l'effet négatif ou positif de B<sub>3</sub> dans la résistance, la lignée isogénique pour ce gène n'étant pas disponible. Des recherches sur la distribution subgénomique des gènes R dans les plantes polyploïdes, et le cotonnier en particulier, revêtent un intérêt primordial pour de

futures investigations. La polyploïdie apparaît en effet comme un mécanisme majeur de création de diversité et de capacités adaptatives. Chez *Arabidopsis*, il a été montré que les allopolyploïdes fabriquent plus de chlorophylle, stockent plus d'amidon et sont moins sensibles aux conditions environnementales (homéostasie). Ces approches permettraient de mieux comprendre la contribution relative des deux sous-génomes dans l'expression des résistances aux parasites.

Au-delà de l'intérêt fondamental pour la compréhension de mécanismes de défense portés par les LOX, le gène *GbLOX1* pourrait être un outil valable pour évaluer des variations physiologiques de la résistance de cotonnier en fonction de zones géographiques aux conditions climatiques différentes (ex. pays d'Afrique, Syrie..) où des gènes *R* sont connus pour être surmontés par de nouvelles races virulentes de *Xcm*. Ainsi, le « test LOX » appliqué à d'autres variétés de cotonnier infectées par d'autres races de *Xanthomonas* reflète une certaine importance pour ces pays. Dans cette optique, une exploration de la diversité de la virulence de *Xcm* vient de débiter en Syrie. Elle porte sur une étude d'une population syrienne de cette bactérie afin de caractériser sa structure génétique et de tenter de comprendre le comportement des génotypes de cotonnier déployés au champ dans la perspective de proposer des alternatives de lutte contre la bactériose qui connaît une recrudescence dans la région (Jalloul *et al.*, résultats non publiés). Une extension régionale de cette étude est envisagée.

Enfin, afin de mieux caractériser la famille des LOXs du cotonnier, il serait judicieux de cloner les 5 autres gènes LOX identifiés par la technique de southern-blot (résultats non publiés). Pour l'heure, deux gènes *GbLOX* ont été clonés, l'un de type 9 (*GbLOX1*), l'autre de type 13 (*GbLOX2*) (Alhamdia, 2004 ; Sanier, 2008). Un troisième, *GbLOX3*, est en cours d'analyse (Marmey *et al.*, résultats non publiés). L'étude du comportement de ces autres gènes *GbLOXn* durant l'interaction affinerait la compréhension de leur place dans la résistance *versus* la maladie, induites par *Xcm*. Elle permettrait surtout de discriminer les fonctions potentiels des 9- et 13-LOX au regard des résultats acquis sur les oxylipines du cotonnier par rapport au devenir des hydroperoxydes (1) de type 9- suite à l'action du gène *GbLOX1* (Jalloul *et al.*, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007) et (2) de type 13-, caractérisés en faible quantité durant l'action incompatible (Jalloul *et al.*, 2002) et dont une fraction est très probablement métabolisée en JA et/ou OPDA (Bouyaakikan, 2009 ; Champion *et al.*, résultats non publiés).

**Les travaux de recherche de la deuxième partie de ma thèse** avaient pour objectif d'amorcer une approche génétique fondée sur la transformation du cotonnier pour la caractérisation fonctionnelle du gène *GbLOX1* dans le but de confirmer son rôle dans l'installation de la RH à *Xcm*. Cette analyse fonctionnelle du gène *GbLOX1* a pu être entreprise

grâce à la disposition d'un outil d'expression transitoire dans un système homologue (*G. hirsutum*, le cultivar Réba B50). Afin de comprendre le rôle de cette protéine *in planta*, nous avons obtenu par transgénèse des cotylédons de cotonnier surexprimant le gène *GbLOX1*. Dans un premier temps, après avoir vérifié la compatibilité entre *A. tumefaciens* et *Xcm* et validé l'efficacité de la transformation génétique du cotonnier traduite par une activité élevée du gène GUS, les expériences d'expression transitoire ont été réalisées en utilisant la souche d'*A. tumefaciens* LBA1119-VIRGN54D contenant l'une des trois constructions (*35S-GbLOX1*, *35S-GFP-GbLOX1* ou *35S-GbLOX1-GFP*) permettant la surexpression du gène *GbLOX1*. Les résultats ont démontré que chez le cotonnier Réba B50, l'infiltration de souches d'*A. tumefaciens* permettant de surexprimer le gène *GbLOX1* sous le contrôle d'un double promoteur 35S n'aboutissait pas à l'apparition de lésions RH sur les cotylédons transformés. La plupart d'entre-eux surexprimant ce gène puis infiltrés par l'une des deux races (18 ou 20) de *Xcm*, ne présentait pas de modifications morphologiques spécifiques. Par contre, les cotylédons de la variété Acala 44, ne contenant aucun gène R connu, transformés avec la construction *35S-GbLOX1* puis infiltrés avec la race *Xcm* 18, affichaient un phénotype ressemblant à celui de la RH. Ces expériences de surexpression du gène *GbLOX1* ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité totale LOX, confirmant que le gène *GbLOX1* code pour une protéine active. Au stade actuel des recherches, mes résultats apportent une première preuve fonctionnelle que le gène *GbLOX1* est associé à la mort cellulaire hypersensible. Enfin, nous nous sommes aussi attachés à étudier l'effet d'*Agrobacterium* sur certaines réponses de défense de la plante en observant une induction du *GbLOX1*, 9h après l'infiltration par une des trois souches d'*Agrobacterium* testées. Les résultats ont montré une induction transitoire de l'expression dans les cotylédons de certains gènes de la voie des octadénoïdes et des facteurs de transcription ERF qui pourrait être la conséquence d'un effet blessure lié à l'infiltration mécanique d'*Agrobacterium* dans les feuilles.

Pour la suite de ce travail concernant l'étude de la fonction du *GbLOX1*, et en plus des expériences proposées dans la conclusion du chapitre 2, il sera intéressant, dans ce système d'expression transitoire, d'étudier la réponse des plantes transformées à différents stimuli hormonaux comme les traitements au SA ou au JA. Dans ce dernier cas, en effet, cette hormone semble jouer un rôle important dans la mise en place de la RH et des recherches sur la voie de biosynthèse du JA dans ce contexte sont en cours d'investigation (Bouyaakikan, 2009 ; Champion *et al.*, résultats non publiés) sur la base de données préalables (Jalloul, 2002). Il a en effet été observé, au laboratoire, que cette hormone est capable d'activer la transcription du gène *GbLOX1* et celle d'une LOX de type 13. Dans ces conditions, l'infiltration de la race virulente



*Xcm* 20 sur des cotylédons de Réba B50 préalablement traités au MeJA a conduit à un phénotype de RH et à une diminution significative de la population bactérienne (Jalloul, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007). A cet égard, l'utilisation de ce système d'expression transitoire est pertinent puisqu'il permettrait de vérifier la validité des expériences préalables du traitement au JA (Jalloul, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007) à condition (1) d'inhiber au préalable l'activité LOX endogène des cotylédons et (2) de transformer alors ces derniers avec une construction contenant un promoteur sensible au JA.

Il a été suggéré que les LOX seules ne pouvaient pas induire la mort cellulaire (Jalloul *et al.*, 2002 ; Rusterucci *et al.*, 1999). Dans ce contexte, Cacas *et al.*, (2005) et Dhont *et al.*, (2000) ont démontré une co-induction des lipide acyle - hydrolases (LAH) et des LOX, les premières étant pourvoyeuses de substrats des secondes. Nous avons alors recherché si une (ou des) LAH étaient activées au cours des réponses de défense chez le cotonnier pour fournir aux LOX les acides gras libres précurseurs des oxylipines. La libération de AGPI des membranes est connue pour être catalysée par les LAH dont certaines ont une activité galactolipase (Cacas *et al.*, 2005 ; La Camera *et al.*, 2009). La co-induction des gènes LAH et 9-LOX a été suggérée comme suffisante pour provoquer la mort cellulaire, supposant que ces enzymes libèrent les AGPI plastidiques et initient la voie de la 9-LOX au cours de la RH de tabac (Cacas *et al.*, 2005). Chez le cotonnier, une activité galactolipase a également été observée pendant la RH à *Xcm* (Cacas *et al.*, 2008). Il a été proposé que le gène *GbPat1* participe à la mobilisation des AGPI des chloroplastes membranaires, initiant de ce fait le processus de peroxydation par le gène *GbLOX1* dont la séquence indique qu'il code une 9-LOX. Les activités transcriptionnelles des gènes *GbPat1* et *GbLOX1* sont à ce titre induites de manière quasi synchrone. Ces observations confirment que la lipase pourrait être l'un des éléments clés et précoces de l'induction de la RH du cotonnier en réponse à *Xcm*. L'analyse fonctionnelle du gène *Gbpat1* par des approches de génétique par suppression de son expression utilisant le système de RNAi, par exemple, devrait contribuer à établir son rôle pendant la mort cellulaire de type hypersensible chez le cotonnier, en découplant son activation de celle du gène *GbLOX1*. Le phénotype alors attendu serait une suppression, ou une forte diminution, des symptômes HR allié à une réduction très significative de l'activité LOX, de l'accumulation des 9-hydroperoxydes et de la transcription du gène *GbLOX1*. Dans cet esprit, l'utilisation des mutants *patatin* d'*A. thaliana* devrait être utile à la validation du rôle de ces gènes dans l'initiation de la voie 9-LOX s'établissant lors de la mort cellulaire de type hypersensible.

D'un point de vue plus global, la famille des gènes LOX chez les plantes possède des caractéristiques intéressantes, incluant leur implication dans les processus de développement et de la mort cellulaire (Brash, 1999 ; Feussner et Wasternack , 2002 ; Maccaronne *et al.*, 2001). En outre, la découverte de nouvelles oxylipines, associée à l'identification de leurs importantes activités biologiques, s'est considérablement accélérée ces dernières années (Anderson *et al.*, 2006 ; Eckart, 2008 ; Farmer *et al.*, 2003 ; Fammartino *et al.*, 2007 ; Kazan et Manners, 2008 ; La Camera *et al.*, 2009 ; Sharma *et al.*, 2006 ; Walter *et al.*, 2006). On peut ainsi s'interroger sur le rôle des 9-LOX dans le système de défensif des plantes en regard de celui qu'elles ont dans la régulation du développement de certains organes et de la diversité des oxylipines produites. Des travaux récents ont non seulement montré que les 9-LOX étaient impliquées dans la morphogénèse des racines d'*A. thaliana* (Vellosillo *et al.*, 2007) et du maïs (Gao *et al.*, 2008a), mais que ces mêmes LOX régulaient le système défensif des racines respectivement contre *P. syringae* et le nématode à galle *M. incognita*. Dans ce dernier cas, le gène *ZmLOX3*, qui code une 9-LOX, contrôlerait la résistance du maïs à ce nématode *via* l'activation d'un gène PAL, à l'origine de la biosynthèse de la vaste famille des composés phénoliques (Gao *et al.*, 2008a). Dans les racines de maïs, le gène *ZmLOX3* réprimerait les voies de signalisation du SA, JA et ETH pour favoriser la croissance de cet organe.

*Meloidogyne incognita*, parasite biotrophe, cause des dégâts considérables aux plantations de cotonnier de par le monde. De vastes programmes de recherche de sources de résistance sont à cet égard en cours en Amérique du Sud, peu de génotypes cultivés étant résistants à ce parasite (McPherson *et al.*, 2004). Dès lors, il serait judicieux d'élargir les connaissances de la nature des mécanismes activés par le système racinaire du cotonnier en réponse à une infestation par *M. incognita*. Les génotypes résistants mettent en place une RH au phénotype cellulaire assez bien caractérisé, mais dont les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent encore très mal connus, tant chez le cotonnier que chez les autres plantes. A ce jour, les cotonniers interagissant de manière incompatible avec *Xcm* ne manifestent aucune résistance à *M. incognita* ni à un autre nématode ravageur des racines, *Rotylenchulus reniformis*. Des travaux réalisés sur *G. hirsutum* résistant infecté par *M. incognita* (Wubben *et al.*, 2008) ont révélé la transcription de 14 gènes (*MIC* ; *Meloidogyne Induced Cotton genes*) spécifiquement induits par les racines et non par l'appareil aérien. Aucun d'entre-eux n'est induit lors de la HR à *Xcm*. Au cours de cette interaction cotonnier/*M. incognita*, la réponse de plusieurs gènes de « référence » a été également testée dont le gène *GbLOX1* pour lequel aucune variation significative du niveau de transcription n'a été constatée durant la HR induite par le nématode.

L'ensemble de ces observations soulève plusieurs interrogations au sujet de la fonction des gènes 9-LOX et de leur régulation chez les plantes et le cotonnier en particulier :

(1) l'expression des 9-LOX en conditions de stress chez le cotonnier dépend-elle de la nature du fond génétique [déjà soupçonnée dans le cas de la résistance à la bactériose (Alhambia *et al.*, 2008)], sachant que les espèces cultivées du genre *Gossypium* sont allotétraploïdes ?

(2) la fonction des 9-LOX étroitement liée à l'exécution de la mort cellulaire hypersensible est-elle uniquement opérationnelle au cours des HR foliaires ? Autrement dit, existe-il des LOX organe-spécifique ?

(3) il y a-t-il des 9-LOX dont la fonction est spécifiquement dédiée à l'exécution de la mort cellulaire et d'autres associées à d'autres fonctions de défense ? Cette question paraît légitime dans la mesure où le gène *ZmLOX3* est capable de contrôler les niveaux de résistance (ou de sensibilité, selon) du maïs à différents agents pathogènes dont *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Cochliobolus heterostrophus* ou *Exserohilum pedicellatum* (Gao *et al.*, 2009).

(4) une même 9-LOX peut-elle partager plusieurs fonctions dont la régulation serait dépendante des conditions de stress de la plante ? Le cas du couple maïs / *M. incognita* est-il généralisable ? Dans ce cas de figure, cette régulation pourrait s'opérer soit de manière post-traductionnelle au niveau de la protéine 9-LOX, soit *via* l'inhibition ou l'activation d'une voie de signalisation comme c'est le cas pour le gène *ZmLOX3* du maïs (Wubben *et al.*, 2008).

Cette dualité fonctionnelle « développement/défense », a également été révélée par Vellosillo *et al.* (2007) au sein des racines d'*A. thaliana* dans lesquelles les oxylipines issues de la voie 9-LOX sont impliquées dans l'élaboration des parois cellulaires liée au développement racinaire et à l'arrêt de la colonisation par *P. syringae*. L'action des 9-hydroperoxydes sur la synthèse de callose (polymère de  $\beta$ -1,3 glucanes) et de pectine (polymère d'acide galacturonique) est ainsi évoquée. Ces auteurs laissent cependant entrevoir un fonctionnement synergique entre la voie des 9-LOX et celle des  $\alpha$ -dioxygénases qui pourrait être vérifié en utilisant des doubles mutants LOX/DOX.

La voie métabolique des oxylipines est très sollicitée dans les stratégies de défense des plantes, révélant l'importance majeure des 13- et 9-LOX pour leur survie aux agressions parasitaires (Blée, 2002). Au sein de cette famille, la voie des octadécanoïdes conduit à la synthèse du JA qui, dans les feuilles de cotonnier, est un candidat au rôle d'activation du gène *GbLOX1* (Jalloul, 2002 ; Marmey *et al.*, 2007). Bien que les travaux sur la synthèse du JA au cours de la HR induite chez le cotonnier par *Xcm* soient en cours d'investigation (Bouyaakikan, 2009 ; Champion *et al.*, non publiés ; Jalloul, 2002), il serait pertinent de vérifier comment cette hormone régule *in*

*planta* la transcription du gène *GhLOX1* ou l'activité de la protéine. Une réponse précise à cette question pourrait conférer au JA une place déterminante dans la régulation de la mort cellulaire hypersensible 9-LOX dépendante chez le cotonnier, dans un premier temps, et chez *A. thaliana*, dans un second temps, lorsqu'elle interagit avec *Xc pv campestris*. Dans cette analyse, l'information selon laquelle l'activation de la voie 9-LOX dans les racines d'*A. thaliana* à des fins de croissance et de défense serait indépendante de la signalisation liée à l'AJ n'est pas anodine (Vellosillo *et al.*, 2007). Elle met en effet en exergue la possibilité d'une variabilité de la signalisation du réseau des oxylipines en terme de capacités adaptatives des plantes aux stress biotiques.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adie A., Pérez-Pérez J., Pérez-Pérez M., Godoy M., Sánchez-Serrano J.J., Schmelz E.A. and Solano R.** 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1665–81
- Alami I., Jouy N. and Clériveret A.** 1999. The lipoxygenase pathway is involved in elicitor-induced phytoalexin accumulation in plane tree *Platanus acerifolia*. cell-suspension cultures. *J. Phytopathol.* **147**: 515-519.
- Alhamdia M.** 2004. La réaction hypersensible du cotonnier *Gossypium hirsutum*. à *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. Caractérisation d'un gène lipoxygénase *GhLOX2* de type 13. DEA ENSAIA, Nancy.
- Alfano J.R. and Collmer A.** 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 385-414.
- Allen R.D.** 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107**: 1049-1054.
- Al-Mousawi A.H., Richardson P.E., Essenberg M. and Johnson W.M.** 1982. Specificity of the envelopment of bacteria and other particles in cotton cotyledons. *Phytopathology* **73**: 484-489.
- Almérás E., Stolz S., Vollenweider S., Reymond P., Mène-Saffrané L. and Farmer E.E.** 2003. Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**: 205-216.
- Ameisen J.C.** 1999. La sculpture du vivant. *eds Senil*. 338 pages.
- Andersson M.X., Hamberg M., Kourtchenko O., Brunnstrom A., McPhail K.L., Gerwick W.H., Gobel C., Feussner I. and Ellerstrom M.** 2006. Oxylinin Profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Mol. Biol.* **281**: 31528–31537.
- Arlat M., Gijsegem F.V., Huet J.C., Pernollet J.C. and Boucher C.A.** 1994. PopA, 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.
- Arnold M.H. and Brown S.J.** 1968. Variation in the host-parasite relationship of a crop disease. *J. Agric. Sci.* **71**: 19-36.
- Asada K.** 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In **Foyer C.H. and Mullineaux P.M.** eds., Causes of photooxidation stress and amelioration of defence systems in plants. *CRC Press Boca Raton*, pages 77-104.
- Assigbetsé K., Cuny G., Valette V., Delannoy E., Bresson E., Jalloul A., Daniel J.F., Geiger J.P. and Nicole M.** 1999. Cloning and characterization of a bacterial-induced Peroxidase encoding cDNA from cotton GenBank accession No. AF155124. *Plant Physiol.* **121**: 312.
- Atkinson G.F.** 1891. The black rust of cotton. *Alabama Agric. Exp. Stat. Bul.* **27**: 1-16.
- Avdiushko S.A., Croft K.P.C., Brown G.C., Jackson D.M., Hamilton-Kemp T.R. and Hildebrand D.** 1995. Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylinin pathway in tobacco, cucumber, and arabidopsis. *Plant Physiol.* **109**: 1227-1230.
- Bailey-Serres J. and Mittler R.** 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* **141**: 311.
- Baker CJ and Orlandi EW.** 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**,: 299-321.
- Baker C.J., Orlandi E.W. and Mock N.M.** 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* **102**: 1341-1344.
- Bauer D.W., Wei Z.M., Beer S.V. and Collmer A.** 1995. *Erwinia chrysanthemi* Harpin: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 484-491.

- Baron C., Domke N., Beinhofer M. and Hapfelmeier S.** 2001. Elevated temperature differentially affects virulence, VirB protein accumulation, and T-pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. *J. Bacteriol.* **183**: 6852–6861.
- Bayles M.B., Essenberg M., Pierce M.L. and Verhalen L.** 2003. A pyramiding of near-isogenic lines of cotton with 0: 1: 2 or 3 genes for bacterial blight resistance. *Phytopathology* **93**:S97.
- Beckers G. and Conrath U.** 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Cur. Op. Plant Biol.* **10**:425-431.
- Benhamou N.** 1996. Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* **1**: 233-240.
- Bennett M., Gallagher M., Fagg J., Bestwick C., Paul T., Beale M. and Mansfield J.** 1996. The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *bremia lactuca*. *Plant J.* **9**: 851- 865.
- Bent A., F.** 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**: 1757-1771.
- Bestwick C.S., Bennett M.H. and Mansfield J.W.** 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 C.S., Brown I.R., Bennett M.H. and Mansfield J.W.** 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolica*. *Plant Cell* **9**: 209-221.
- Bhagwat V.Y. and Bhide V.P.** 1962. Vascular infection of some cottons by *Xanthomonas malvacearum*. *Ind. Cot. Grow. Rev.* **16**: 80-83.
- Blée E.** 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* **7**: 315-322
- Blée E. and Joyard J.** 1996. Enveloppe membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acids hydroperoxides. *Plant Physiol.* **110**: 445-454.
- Boher B., Brown I., Nicole M., Kpemoua K., Bonas U., Geiger J.P. and Mansfield J.** 1996. Histology and cytochemistry of interactions between plants and *Xanthomonas*. In: Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions. Nicole N. and Gianinazi-Pearson V. eds. Dordrecht : Kluwer Academic publishers, 193-210.
- Boller T.** 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 189-214.
- Boller T. and He S.Y.** 2009. Innate immunity in plants : an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**: 742 – 744.
- Boller T.** 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 189-214.
- Bolwell G.P. and 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 G.P., Davies D.R., Gerrish C., Auh C.K. and Murphy T.M.** 1998. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* **116**: 1379-1385.
- Bonas U. and 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.

- Bonaventure G Feller A Proebsting W., Hörtensteiner S., Chételat A., Martinoia E. and Farmer E.E.** 2007. A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*. *Plant J.* **49**: 889-98
- Bostock R.M., Kuc J.A. and Laine R.A.** 1981. Eicosapentenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungi toxic sesquiterpenes in potato. *Science* **212**: 67-69.
- Bostock R.M., Yamamoto H., Choi D., Ricker K.E. and Ward B.L.** 1992. Rapid stimulation of 5-lipoxygenase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic acid. *Plant Physiol.* **100**: 1448-1456.
- Bostock R.M.** 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**: 99-109.
- Bouyaakikan N.** 2009. Rôle du jasmonate dans l'infection des cellules de cotonnier par une bactérie pathogène. Rapport de stage Master 2: Université de Montpellier 2.
- Bozhkov P.V., Filonova L.H., Suarez M.F., Helmersson A., Smertenko A.P., Zhivotovsky B. and von Arnold S.** 2004. VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ* **11**: 175-182.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brash A.** 1999. Lipoxygenases : occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **274**: 23679-23682.
- Breusegem F. and Dat J.F.** 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* **141**: 384-390.
- Brinkerhoff L.A. and Fink G.B.** 1964. Survival infectivity of *Xanthomonas malvacearum* in cotton plant debris and soil. *Phytopathology* **54**: 1198-201.
- Brinkerhoff L.A. and Hunter R.E.** 1963. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cycle of bacterial blight of cotton. *Phytopathology* **53**: 1397-401.
- Brinkerhoff L.** 1963. Variability of *Xanthomonas malvacearum*: the cotton bacterial blight pathogen. *Okla. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull.* **98**.
- Brinkerhoff L., Verhalen L., Johnson W.M., Essenberg M. and Richardson P.** 1984. Development of immunity to bacterial blight of cotton and its implications for other diseases. *Plant Dis.* **68**: 168-173.
- Bryan G.T., Jia Y., Farrall L., Wu K.S., Hershey H.P., McAdams A.S., Faulk K.N., Donaldson G.K., Tarchini R. and Valent B.** 1999. Molecular characterisation of resistance gene/avirulence gene interaction in the rice blast system. *9<sup>th</sup> International congress on Molecular Plant-Microbe interactions* Amsterdam The Netherlands St. Paul Minnesota, USA.
- Buonauro R. and Servili M.** 1999. Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **54**: 155-169.
- Buttner D. and Bonas U.** 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Op. Microbiol.* **9**: 193-200.
- Cacas J.L., Vaillau F., Davoine C., Ennar N., Agnel J.P., Tronchet M., Ponchet M., Blein J.P., Roby D., Triantaphylidès C., and Montillet J.L.** 2005. The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant Cell Env.* **28**:1367–1378.
- Cacas J.L., Marmey P., Alhambia M., Jalloul A., Rojas-Mendoza A., Clériveret A., Nicole M. and Montillet J.L.** 2008. Patatin-like genes are specifically expressed in cotton during *Xanthomonas campestris*-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell Rep.* **28**: 155-164.
- Chamngopol S., Willekens H., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D. and Van Camp W.** 1996. Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis related expression under high light. *Plant J.* **10**: 491-503.
- Champion A., Hébrard E., Parra B., Bournaud C., Marmey M., Tranchant C. and Nicole**



- M. 2009. Analysis of molecular diversity of ERF transcription factors reveals that cotton ERF group IXa members are responsive to jasmonate and *Xanthomonas*. *Mol. Plant Pathol.* **10**: 471-485.
- Chandra S., Heinsteins P.F. and Low P.S.** 1996a. Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* **110**: 979-986.
- Chandra S., Martin G.B. and Low P.S.** 1996b. The *Pto* Kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13393-13397.
- Cheng Q., Zhang B., Zhuge Q., Zeng Y., Wang M. and Huang M.** 2006. Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in *Populus deltoides*. *Plant Sci.* **170**: 1027-1035.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B.J.** 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814.
- Chong J., Baltz R., Fritig B. and Saindrean P.** 1999. An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism. *FEBS Lett.* **17**: 204-208.
- Clough S.J., Fiegler K.A., Yu I.C., Lippok B., Smith R.K. and Bent A.F.** 2000. The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 9323-9328.
- Cohen Y., Gisi U. and Mösinger E.** 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* **83**: 1054-1062.
- Cook R.J.** 1998. The molecular mechanisms responsible for resistance in plant-pathogen interactions of the gene-for-gene type function more broadly than previously imagined. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9711-9712.
- Cornelis G.R. and Wolf-Watz H.** 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**: 861-867.
- Côté F. and Hahn M.G.** 1994. Oligosaccharins: structure and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* **12**: 655-662.
- Creelman RA, Tierney ML and 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.
- Creelman R.A. and Mullet J.E.** 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 355-381.
- Croft K.P., R., Juttner and A.J., Slusarenko.** 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* L. leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* sv *phaseolicola*. *Plant Physiol.* **101**: 13-24.
- Daï G.H., Nicole M., Martinez C., Bresson E., Daniel J.F., Andary C. and Geiger J.P.** 1996. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18 and cotton. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**: 285-306.
- Dangl J.L.** 1994. The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**: 99-118.
- Dangl J.L., Dietrich R.A. and Richberg M.H.** 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807.
- Davila-Huerta G., Hamada H., Davis G.D., Stipanovic R.D., Adams C. and Essenberg M.** 1994. Cadinane-type sesquiterpenes induced in *Gossypium* cotyledons by bacterial inoculation. *Phytochemistry* **39**: 531-536.
- Davis E.M., Tsuji J., Davis G.D., Pierce M.L. and Essenberg M.** 1996. Purification of +-delta-cadinene synthase, a sesquiterpene cyclase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Phytochemistry* **41**: 1047-55.
- De Feyter R., Yang Y. and Gabriel D.W.** 1992. Gene-for-gene interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 225-237.

- De Feyter R Mc Fadden H. and Dennis L.** 1998. Five avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* cause genotype-specific cell death when expressed transiently in cotton. *Mol Plant Microbe Interact.* **11**: 1030-1038.
- De Feyter R., Yang Y., and Gabriel D.W.** 1993. Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**: 225-237.
- De Wit P.J.G.M.** 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 P.J.G.M.** 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* **2**: 452-458.
- Delannoy E., Jalloul A., Assigbetsé K., Marmey P., Geiger J.P., Lherminier J., Daniel J.F., Martinez C. and Nicole M.** 2003. Activity of class III peroxidases during defense of cotton to bacterial blight. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 1030-1038.
- Delannoy E., Lyon B., Marmey P., Jalloul A., Montillet J.L., Daniel J.F., Essenberg M. and Nicole M.** 2005. Resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 62-82.
- Delannoy E., Marmey P., Penel C. and Nicole M.** 2004. Les peroxydases végétales de classe III. *Acta Bot. Gal.* **151**: 353-380.
- Delannoy E., Marmey P., Jalloul A. and Nicole M.** 2006. Molecular analysis of cotton peroxidases. *J. Cot. Sci.* **10**: 53-60.
- Del Pozo O. and Lam E.** 1998. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr. Biol.* **8**: 1129-1132.
- Del Rio L.A., Sandalio L.M., Palma J.M., Bueno P. and Corpas F.J.** 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic. Biol. Med.* **13**: 557-580.
- Deng, W., Grayburn W.S., Hamilton-Kemp T.R., Collins G.B. and Hildebrand D.F.** 1992. Expression of soybean-embryo lipoxygenase 2 in transgenic tobacco tissue. *Planta* **187**: 203-208.
- Desikan R., Hancock J.T., Coffey M.J. and Neill S.J.** 1996. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* **382**: 213-217.
- Dhont S., Geoffroy P., Stelmach B.A., Legrand M. and Heitz T.** 2000. Soluble phospholipase A<sub>2</sub> activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J.* **23**: 431-440.
- Dietrich R.A., Delaney T.P., Uknes S.J., Ward E.R., Ryals J.A. and Dangl J.L.** 1994. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **7**: 565-577.
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C and Dangl JL.** 1997. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**: 685-694.
- Dillen W., DeClercq J., Kapila J., Zambre M., VanMontagu M. and Angenon G.** 1997. The effect of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. *Plant J.* **12**: 1459-1463.
- Dinesh-Kumar S.P., Whitham S., Choi D., Hehl R., Corr C. and Baker B.** 1995. Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene N: Its possible role in the TMV-N-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4175-4180.
- Ditt R.F., Nester E.W. and Comai L.** 2001. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. NY* **98**: 10954-10959.
- Dixon M.S., Golstein C., Thomas C.M., van der Biezen E.A. and Jones J.D.G.** 2000. Genetic complexity of pathogen perception by plants : the example of *Rcr3*: a tomato gene required specifically by *Cf-2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8807-8814.
- Doares S.H., Narváez-Vásquez J., Conconi A. and Ryan C.A.** 1995. Salicylic acid inhibits

- synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **108**: 1741-1746.
- Doke N.** 1983a. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant pathol.* **23**: 345-357.
- Doke N.** 1983b. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts upon the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* **23**: 359-367.
- Dong X.** 1998. SA, JA, ethylene and disease resistance in plants. *Cur. Op. Plant Biol.* **1**: 316-323.
- Dorey S., Baillieul F., Pierrel M., A., Saindrenan P., Fritig B. and Kauffmann S.** 1997. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 646-655.
- Dransfield M.** 1969. Report from Northern States, Nigeria. Empire Cotton Growing Corporation. *Rep. Exp. Stat.* 24-26.
- Draper J.** 1997. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci.* **2**: 162-165.
- Drew M.C., He C.J. and Morgan P.W.** 2000. Programmed cell death and parenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci.* **5**: 123-127.
- Dwyer S.C., Legendre L., Low P.S. and Leto T.L.** 1996. Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**: 231-237.
- Dye D.W., Bradbury J.F., Goto M., Hayward A.C., Lellot R.A. and Schroth M.N.** 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* **59**: 153-168.
- Ebel J. and Mithöfer A.** 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: 335-348.
- Eckart N.A.** 2008. Oxilipins signalling in plant stress responses. *The Plant Cell* **20**: 495-497.
- Edgerton C.W.** 1912. The rots of the cotton boll. *Agr. Exp. St. Bul.* **137**: 133p.
- Edwards W., R., Hall J.A., Rowlan A.R., Schneider-Barfield T., Sun T.J., Patil M.A., Pierce M.L., Fulcher R., G., Bell A.A. and Essenberg M.** 2008. Light filtering by epidermal flavonoids during the resistant response of cotton to *Xanthomonas* protects leaf tissue from light-dependent phytoalexin toxicity. *Phytochemistry* **69**: 2320-2328.
- Ellis C. and Turner J.G.** 2001. The Arabidopsis mutant *cer1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**: 1025-1033.
- Ellis J., Dodds P. and Pryor T.** 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Cur. Op. Plant Biol.* **3**: 278-284.
- Essenberg M., Bayles M.B., Samad R., Hall J., Brinkerhoff L. and Verhalen L.** 2002. Four near-isogenic lines of cotton with different genes for bacterial blight resistance. *Phytopathology* **92**:1323-1328.
- Essenberg M., Doherty M., Hamilton B.K., Heenning V.T., Cover E.C., Mcfaul S.J. and Johnson W.M.** 1982. Identification and effects on *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* of two phytoalexins from leaves and cotyledons of resistant cotton. *Phytopathology* **72**: 1349-1356.
- Essenberg M., Grover P.B. Jr and Cover E.C.** 1990. Accumulation of antibacterial sesquiterpenoids in bacterially inoculated inoculated *Gossypium* leaves and cotyledons. *Phytochemistry* **29**: 3107-3113.
- Essenberg M., Pierce M., Cover E.C., Hamilton B., Richardson P.E. and Scholes V.E.** 1992a. A method for determining phytoalexin concentration in fluorescent, hypersensitively necrotic cells in cotton leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **41**: 101-109.

- Essenberg M., Pierce M., Hamilton B., Cover E.C., Scholes V.E. and Richardson P.E.** 1992b. Development of fluorescent, hypersensitively necrotic cells containing phytoalexins adjacent to colonies of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **41**: 85-99.
- Essenberg M. and Pierce M.** 1994. Sesquiterpenoid phytoalexins synthesised in cotton leaves and cotyledons during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. In: *Handbook of phytoalexin metabolism and action*. Daniel M. and Purkayastha R.P. eds. New York, Basel Hong Kong : Marcel Dekker, Inc. pages 183-198.
- Esterbauer H., Schur R.J. and Zollner H.** 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**: 81-128.
- Fammartino A., Cardinale F., Göbel C., Mène-Saffrané L., Fournier J., Feussner I. and Esquerré-Tugayé M., T.** 2007. Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco. *Plant Physiol.* **143**: 378-388.
- Farmer E.E.** 1994. Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1423-1437.
- Farmer E.E., Johnson R.R. and Ryan C.A.** 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **98**: 995-1002.
- Farmer E.E. and Ryan C.A.** 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7713-7716.
- Farmer E.E. and Ryan C.A.** 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134.
- Farmer E.E., Alméras E. and Krishnamurthy V.** 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 372-378
- Faulwetter R.C.** 1917. Wind-blown rain, a factor in disease dissemination. *J. Agric. Res.* **10**: 639-48.
- Felix G., Duran J.D., Volko S. and Boller T.** 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**: 265-276.
- Feussner I. and Wasternack C.** 2002. The lipoxygenase pathway. *Ann. Rev. Plant Biol.* **53**: 275-297.
- Feussner I., Balkenhohl T.J., Porzel A., Külin H. and Wasternack C.** 1997. Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. *J. Biol. Chem.* **272**: 21635-21642.
- Feussner I., Bachmann A., Hohne M. and Kindl H.** 1998. All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. *FEBS Lett.* **431**: 433-436.
- Feussner I., Kühn H. and Wasternack C.** 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* **6**: 268-273.
- Fickers P., Destain J. and Thonart P.** 2008. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques and applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **1**: 119-130.
- Findlay W.P.K.** 1928. Some conditions influencing the development of bacterial disease of cotton *Bacterium malvacearum*.. *Emp. Cot. Grow. Rev.* **5**: 29-39.
- Flor H.H.** 1942. Interitance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**: [Abstract].
- Flors V., Ton J., van Doorn R., Jakab G., García-Agustín P. and Mauch-Mani B.** 2008. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicola*. *Plant J.* **54**: 81-92
- Follin J.C.** 1983. Races of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* Smith. Dye in Western and Central Africa. *Cot. Fib. Trop.* **38**: 277-280.
- Follin J.C., Girardot B., Mangano V. and Benitez R.** 1988. Nouveaux resultats sur le déterminisme génétique de la résistance foliaire totale du cotonnier *Gossypium hirsutum* L.. à

- la bactériose *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* Smith. Dye, race 18 et 20. *Cot. Fibres Trop.* **3**: 167-175.
- Foyer C.H.** 1993. La résistance des plantes à l'oxygène. *La Recherche* **24**: 270-276.
- Freytag S., Arabatzis N., Hahlbrock K. and Schmelzer E.** 1994. Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions. *Planta*. **194**: 123-135.
- Fritig B., Heitz T. and Legrand M.** 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 16-22.
- Fukuda H.** 2000. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**: 245-253.
- Gabriel D.W., Burges A. and Lazo G.R.** 1986. Gene for gene interaction of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6415-6419.
- Gao X., Starr J., Göbel C., Engelberth J., Feussner I., Tumlinson J. and Kolomiets M.** 2008a. Maize 9-lipoxygénase *ZmLOX3* controls development, root specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**: 98-109.
- Gao X., Stumpe M., Feussner I. and Kolomiets M.** 2008b. A novel plastidial lipoxygenase of maize *Zea mays*. *ZmLOX6* encodes for a fatty acid hydroperoxide lyase and is uniquely regulated by phytohormones and pathogen infection. *Planta* **227**: 491-503.
- Gao X., Brodhagen M., Isakeit T., Horowitz Brown S., Göbel C., Betran X., Feussner I., Keller N.P. and Kolomiets M.W.** 2009. Inactivation of the lipoxygenase *ZmLOX3* increases susceptibility of maize to *Aspergillus* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**: 222-231.
- Girardot B., Hequet E., Yehouessi M.T. and Guibordeau P.** 1986. Finding a variety of *Gossypium hirsutum* L. resistant to strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* Smith. Dye virulent on associations of major genes  $B_2B_3$  or  $B_{9L}-B_{10L}$ . *Coton Fibres Trop.* **41**:67-69.
- Glazebrook J.** 1999. Genes controlling expression of defense response in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 280-286.
- Glazener J.A., Orlandi E.W. and Baker C.J.** 1996. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.* **110**: 759-763.
- Göebel C., Feussner I., Schmidt A., Scheel D., Sanchez-Serrano J., Hamberg M. and Rosahl S.** 2001. Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 6267-6273.
- Göebel C., Feussner I., Hamberg M. and Rosahl S.** 2002. Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **1584**: 55-64
- Göbel C., Feussner I. and Rosahl S.** 2003. Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *J. Biol. Chem.* **278**: 52834-52840
- Goodman R.N. and Novacky A.J.** 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. *St. Paul APS Press* 244 p.
- Gopalan S. and He S.Y.** 1996. Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. *Plant Dis.* **80**: 604-608.
- Gorski P.M., Vickstrom T.E., Pierce M.L. and Essenberg M.** 1995. A C-13-pulse-labeling study of phytoalexin biosynthesis in hypersensitively responding cotton cotyledons. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**: 339-355.
- Granado J., Felix G. and Boller T.** 1995. Perception of fungal sterols in plants. *Plant Physiol.* **107**: 485-490.
- Grechkin A.** 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* **37**: 317-352.

- Green J.N.M. and Brinkerhoff L.A.** 1956. Inheritance of 3 genes for bacterial blight resistance in upland cotton. *Agro. J.* **48**: 481-5.
- Greenberg J.T.** 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12094-12097.
- Greenberg J.T.** 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 525-545.
- Greenberg J.T., Guo A., Klessig D.F. and Ausubel F.M.** 1994. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**: 551-563.
- Groom O.J., Torres M.A., Fordham-Skelton A.P., Hammond-Kosack K.E., Robinson N.J. and Jones J.D.G.** 1996. *rbobA*, a rice homologue of the mammalian gp91<sup>phox</sup> respiratory burst oxidase. *Plant J.* **10**: 515-522.
- Gu Y.Q., Yang C., Thara V., K., Zhou J. and Martin G.B.** 2000. *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the *Pto* kinase. *The Plant Cell* **12**: 771-785.
- Gundlach H., Müller M.J., Kutchan T.M. and Zenk M.H.** 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2389-2393.
- Hahn M.G.** 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 387-412.
- Halitschke R. and Baldwin T.** 2003. Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant J.* **36**: 794-807.
- Hamberg M., Sanz A., Rodriguez M.J., Calvo A.P. and Castresana C.** 2003. Activation of the Fatty Acid  $\alpha$ -Dioxygenases Pathway during Bacterial Infection of Tobacco Leaves. Formation of oxylipins protecting from cell death. *J. Biol. Chem.* **278**: 51796-51805
- Hammond-Kosack K.E. and Jones D.G.** 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 575-607.
- Hammond-Kosack K.E., Silverman P., Raskin I. and Jones J.D.G.** 1996. Race-specific elicitors of *Cladosporium fluvum* 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.
- Hansford G.G.** 1932. Blackarm disease of cotton in Uganda. *Emp. Cot. Grow.Rev.* **9**: 21-31.
- Hause, B., Weichert H., Hohne M., Kindl H. and Feussner I.** 2000. Expression of cucumber lipid-body lipooxygenase in transgenic tobacco: lipid-body lipooxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies. *Planta* **210**: 708-714.
- Heath M.C.** 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**: 117-124.
- Heath M.C.** 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**: 321-334.
- Heitz T., Dhondt S., Gouzerh G., Geoffroy P. and Legrand, M.** 2002. Des dérivés d'acides gras dans la résistance des plantes aux attaques microbiennes : à la recherche d'acyl hydrolases impliquées dans la synthèse des oxylipines. *Olé, Corps Gras, Lip.* **1** : 37-72
- Heitz T., La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S., Geoffroy P. and Legrand M.** 2004. Pathogen-induced lipid acyl hydrolases and oxylipin metabolism. *The international Joint Workshop on PR-proteins and induced resistance*. Denmark.
- Hillocks R.J.** 1984. Production of cotton plants resistant to *Fusarium* wilt with special reference to Tanzania. *Trop.Pest Manag.* **30**: 234-246.
- Hillocks R.J.** 1992. Cotton Diseases. CAB International. Melksham : Redwood Press. 415p.
- Hills M.J. and Mukherjee K.D.** 1990. Triacylglycerol lipase from rape *Brassica napus* suitable for biotechnological purposes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **26**: 1-10.
- Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Millman C.L. and Korsmeyer S.J.** 1993. *Bcl-2* functions in an antioxidant to prevent apoptosis. *Cell* **75**: 241-251.

- Hoeberichts F.A. and Woltering E.J.** 2002. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* **25**: 47-57
- Holk A., Rietz S., Zahn M., Quader H. and Scherer G.F.** 2002. Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol.* **130**: 90-101.
- Hornung E., Walther M., Kühn H. and Feussner I.** 1999. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenase species by site directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4192-4197.
- Howe G.A. and Schilmiller A.** 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Op. Plant Biol.* **5**: 230-236.
- Hunter R.E., Brinkerhoff L.A. and Bird L.S.** 1968. Development of a set of Upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology* **58**: 830-2.
- Hutcheson S.W.** 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 59-90.
- Innes N.L.** 1966. Inheritance of resistance to bacterial blight of cotton. 3. *Herbaceum* resistance transferred to tetraploid cotton. *J. Agri. Sci.* **66**: 433-439.
- Innes N.** 1983. Bacterial blight of cotton. *Biol. Rev.* **58**: 157-176.
- Itoh A. and Howe G.A.** 2001. Molecular cloning of a divinyl ether synthase: identification as a CYP74 cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.F* **276**: 3620–3627.
- Jabs T., Dietrich R.A. and Dangel J.F.** 1996. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**: 1853-1856..
- Jalloul A.** 2002. La peroxydation des lipides : origine et rôle dans la mort cellulaire hypersensible du cotonnier *Gossypium hirsutum* à *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier 2, 137 pages.
- Jalloul A., Montillet J.L., Assigbetsé K., Agnel J.P., Delannoy E., Daniel J.F., Marmey P., Geiger J.P. and Nicole M.** 2002. Lipid peroxidation in cotton – *Xanthomonas* interactions. Role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction and leaf blight. *Plant J.* **32**: 1-12.
- Jin S., Song Y.-N., Deng W.Y., Gordon M.P. and Nester E.W.** 1993. The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **175**: 6830–6835.
- Johal G.S. and Briggs S.P.** 1992. Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science* **258**: 985-987.
- Jones J.D. and Dangel J.L.** 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Jones A.** 2000. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.* **5**: 225-229.
- Kato T., Ohta H., Tanaka K. and Shibata D.** 1992. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. *Plant Physiol.* **98**: 324-330.
- Katsir L., Chung H.S., Koo A.J.K. and Howe G.A.** 2008. Jasmonate signalling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Cur.Op. Pant Biol.* **11**: 428-435.
- Katz V.A., Thulke O.U. and Conrath U.** 1998. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol.* **117**: 1333-1339.
- Kauss H. and Jeblick W.** 1995. Pretreatment of Parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* **108**, 1171-1178.
- Kazan K. and Manners J.M.** 2008. Jasmonate signaling : toward an integrated view. *Plant Physiol.* **146**: 159-1468.
- Keen N.T.** 1990. Gene for gene complementarity in plant pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 447-463.
- Keen N.T.** 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol. Biol.* **19**: 109-122.
- Keller T., Damude H.G., Werner D., Doerner P., Dixon R. and Lamb C.** 1998. A plant

- homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91<sup>phox</sup> subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266.
- Kenton P., Mur L.A.J., Atzorn R., Wasternack C. and Draper J.** 1999. Jasmonic acid accumulation in tobacco hypersensitive response lesions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 74-78.
- Kepler L.D., Baker C.J. and Atkinson M.M.** 1989. Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology* **79**: 974-978.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R.** 1972. Apoptose : abasic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.
- Kieffer F., Simon-Plas F., Maume B.F. and Blein J.P.** 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.
- Kjemtrup S., Nimchuck Z. and Dangel J.** 2000. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Cur. Op. Microbiol.* **3**: 73-78.
- Knight R.L.** 1944. The genetics of blackarm resistance. 4. *Gossypium punctatum* Sch. and Thom.. crosses. *J. Genet.* **46**: 1-27.
- Knight R.L.** 1946. Breeding cotton resistant to blackarm disease *Bacterium malvacearum*.. *Emp. J. Exp. Agric.* **14**: 153-74.
- Knight R.L.** 1948. The genetics of blackarm resistance. 6. Transference of resistance from *Gossypium arboreum* L. to *G. Barbadense*. *J. Genet.* **48**: 359-69.
- Knight R.L.** 1950. The genetics of blackarm resistance. 8. *Gossypium barbadense*. *J. Genet.* **50**: 67-76.
- Knight R.L.** 1953a. The genetics of blackarm resistance. 9. The gene B<sub>6m</sub> from *Gossypium arboreum*. *J. Genet.* **51**: 270-5.
- Knight R.L.** 1953b. The genetics of blackarm resistance. 10. The gene B<sub>7</sub> from Stoneville 20. *J. Genet.* **51**: 515-19.
- Knight R.L.** 1954a. Cotton breeding in the Sudan. Part 1. Egyptian cotton. *Emp. J. Exp. Agric.* **22**: 68-80.
- Knight R.L.** 1954b. Cotton breeding in the Sudan. Part 3. American Upland cotton. *Emp. J. Exp. Agric.* **22**: 176-84.
- Knight R.L.** 1963. The genetics of blackarm resistance. 12. Transference of resistance from *Gossypium herbaceum* to *Gossypium barbadense*. *J. Genet.* **58**: 324-46.
- Knight R.L. and Clouston T.W.** 1939. The genetics of blackarm resistance. 1. Factors B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>. *J. Genet.* **38**: 133-59.
- Koch, E., Meier B.M., Eiben H.G. and Slusarenko A.J.** 1992. A lipoxygenase from leaves of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. is induced in response to plant pathogenic Pseudomonads. *Plant Physiol.* **99**: 571-576.
- Kolomiets M., V., Chen H., Gladon R., J., Braun E., J. and Hannapel D., J.** 2000. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol.* **124**: 1121-1130.
- Kolomiets M.V., Hannapel D.J., Chen H., Tymeson M. and Gladon R.J.** 2001. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* **13**: 613-626.
- Koorneef A. and Pieterse C.** 2008. Crosstalk in defense signaling. *Plant Physiol.* **146**: 839-844.
- Kwack J.M., Nguyen V. and Schroeder J.I.** 2006. The role of reactive oxygen species in hormonal response. *Plant Physiol.* **141**: 323-329.
- La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S., Hoffmann L., Fritig B., Legrand M. and Heitz T.** 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.* **198**: 267-284.



- La Camera S., Balagué C., Göbel C., Geoffroy P., Legrand M., Feussner I., Roby D. and Heitz T.** 2009. The Arabidopsis patatin-like protein 2 PLP2. plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**: 469-481.
- Lahaye T. and Bonas U.** 2001. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.* **6**: 479-485.
- Lamb C.J., Lawton M.A., Dron M. and Dixon R.A.** 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**: 215-224.
- Lamb C. and Dixon R.A.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-275.
- Lawton K., A., Potter S.L., Uknes S. and Ryals J.** 1994. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* **6**: 581-588.
- Leach J.E. and White F.F.** 1996. Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 153-179.
- Léon J. and Sanchez-Serrano J.J.** 1999. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **37**: 373-380.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. and Lamb C.** 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593.
- Leyendecker P.J.** 1950. Plant disease survey for New Mexico. *Plant Dis. Rep.* **34**: 39-44.
- Lindgren P.B., Peet R.C. and Panopoulos N.J.** 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of non host plants. *J. Bacteriol.* **168**: 512-522.
- Liu J., Liu X., Dai L. and Wang G.** 2007. Recent Progress in Elucidating the Structure, Function and Evolution of Disease Resistance Genes in Plants. *J. Gen. Genom.* **34**: 765-776.
- Logan C.** 1960. An estimate of the effect of seed treatment in reducing cotton crop losses caused by *Xanthomonas malvacearum* E. F. Smith. Dow in Uganda. *Emp. Cot. Grow. Rev.* **37**: 241-255.
- Lorrain S., Vaillau F., Balagué C. and Roby D.** 2003. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* **8**: 263-271.
- Low P.S. and Merida J.R.** 1996. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiolgia Plantarum* **96**: 533-542.
- Maccarrone M., Melino G. and Finazzi-Agro A.** 2001. Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death. *Cell Death Diff.* **8**: 776-784.
- Maccarrone M., van Zadelhoff G., Veldick G.A., Vliegenhart J.F.G. and Finazzi-Agro A.** 2000. Early activation of lipoxygenase in lentil *Lens culinaris*. root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5078-5084.
- Maleck K. and Dietrich R.A.** 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* **4**: 215-219.
- Mansfield J.W., Bennet M.H.R., Bestwick C.S. and Woods-Toer A.** 1997. Phenotypic expression of gene-for-gene interaction involving fungal and bacterial pathogens: variation from recognition to response. *In: The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions.* Crute, I.R., Holub, E. B. and Burdon, J. J. eds. CAB International, 265-291.
- Marmey P., Jalloul A., Alhamdia M., Assigbetsé K., Cacas J.L., Voloudakis A., Champion A., Clériveret A., Montillet J.L and Nicole M.** 2007. Cloning of a 9-lipoxygenase involved in the signalling pathway of the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Plant Physiol. Biochem.* **45**: 596-606.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D. and Tanksley S.D.** 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436.
- Martin G.B.** 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 273-279.

- Martinez C., Montillet J.L., Bresson E., Agnel J.P., Daniel J.F., Geiger J.P. and Nicole M.** 1998. Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1038-1047.
- Martinez C., Baccou J.C., Bresson E., Baissac Y., Daniel J.F., Jalloul A., Montillet J., L., Geiger J.P., Assigbetsé K. and Nicole M.** 2000. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in the local and systemic resistance of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* race 18. *Plant Physiol.* **122**: 757-766.
- Massey R.E.** 1929. Blackarm disease of cotton: the development of *Pseudomonas malvacearum* E.F. Smith within the cotton plant. *Emp. Cot. Grow. Rev.* **6**: 124-46.
- Massey R.E.** 1930a. Studies on blackarm disease of cotton. 1. *Emp. Cot. Grow. Rev.* **7**: 181-95.
- Massey R.E.** 1930b. Studies on blackarm disease of cotton. 2. *Emp. Cot. Grow. Rev.* **7**: 181-95.
- May M.J., Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.G.** 1996. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* **110**: 1367-1379.
- McPherson M.G., Jenkins J.N., Watson C.E. and McCarthy J.C** 2004. Inheritance of root knot nematode resistance in M-315 RNR and M78-RNR cotton. *J. Cot. Sci.* **8**: 154-161.
- Mehdy M.C.** 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**: 467-472.
- Melan M.A., Dong X.N., Endara M.E., Davis K.R., Ausubel F.M. and Peterman T.K.** 1993.. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* **101**: 441-450.
- Méne-Saffrané L., Esquerre-Tugaye M.T. and Fournier J.** 2003. Constitutive expression of an inducible lipoxygenase in transgenic tobacco decreases susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *Mol. Breed.* **12**: 271–282.
- Midland S.L., Keen N.T., Sims J.J., Midland M.M., Burton V., Smith M.J., Mazzola E.P., Graham K.J. and Clardy J.** 1993. The structures of syringolides 1 and 2: novel c-glycosidic elicitors from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Org. Chem.* **58**: 2940-2945.
- Mignery G.A., Pikaard C.S and Park W.D.** 1988. Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene* **62**: 27-44.
- Mittler R., Feng X. and 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. and Lam E.** 1995. Identification, characterization, and purification of tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response. *Plant Cell* **7**: 1951-1962.
- Morel J.B. and Dangl J.L.** 1997. The hypersensitive response and identification of cell death in plants. *Cell Death Different.* **4**: 671-683.
- Montillet J.L., Agnel J.P., Ponchet M., Vailleau F., Roby D. and Triantaphylidès C.** 2002. Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 633-639.
- Montillet J.L., Cacas J.L., Garnier L., Montané M.H., Douki T., Bessoule J.J., Polkowska-Kowalczyk L., Maciejewska U., Agnel J.P., Vial A. and Triantaphylidès C.** 2004. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses. *Plant J.* **40**: 439-451
- Montillet J.L., Chamnongpol S., Rusterucci C., Dat J., van de Cotte B., Agnel J.P., Battesti C., Inze D., Van Breusegem F. and Triantaphylidès C.** 2005. Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **138**: 1516-1526
- Mur L.A.J., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H. and Prats E.** 2008. The hypersensitive response ; the century is upon us but much do we know? *J. Exp. Bot.* **59**: 501-520.

- Mur L.A.J., Naylor G., Warner S.A., Sugars J.M., White R.F. and Draper J.** 1996. Salicylic acid potentiates defense gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J.* **9**: 559-571.
- Nan-nan L., Ling J., Wen-wei Z., Ling-long L., Hu-qu Z. and Jian-min W.** 2008. Role of LOX3 gene in alleviating adverse effects of drought and pathogens in rice. *Rice Sci.* **15**: 276-282
- Narusaka Y., Narusaka M., Seki M., Fujita M., Ishida J., Nakashima M., Enju A., Sakurai T., Satou M. and Kamiya A.** 2003. Expression profiles of Arabidopsis phospholipase A IIA gene in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol*, **44**: 1246-1252.
- Nemhauser J.L., Hong F. and Chory J.** 2006. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467-475.
- Nicole M., Daniel J.F., Bresson E., Martinez C., El-Bachir O., Lopez F., Assigbetsé K., Fernandez D., Montillet J.L. and Geiger J.P.** 1998. The hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Rec. Res. Develop. Microbiol.* **2**: 641-654.
- Norman-Setterblad C., Vidal S. and Palva E.T.** 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 430-438.
- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B. and Piater L.** 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**: 249-266.
- Oliw E.H.** 2002. Plant and fungal lipoxygenases. Prostaglandins other lipid. *Mediat.* **68**: 313-323.
- Orozco-Cárdenas M.L. and Ryan C.A.** 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.
- Orozco-Cárdenas M.L., Narváez-Vásquez J. and Ryan C.A.** 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179-191.
- Parchmann S., Gundlach H. and Mueller M.J.** 1997. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* **115**: 1057-1064.
- Parent C., Capelli N. and Dat J.** 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comp. Rend. Acad. Sci. Inst. Fr. série Biologie* doi:10.1016/j.crv.2008.02.001
- Parry G.** 1982. Le cotonnier et ses produits. *Technique en Agriculture et Production Tropicale* Lavoisier..
- Pauwels L., Inzé D. and Goossens A.** 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends Plant Sci.* **14**:87-91.
- Pena-Cortes H., Albrecht T., Prat S., Weiler E.W. and Willmitzer L.** 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**: 123-128.
- Peng Y.L., Shirano Y., Ohta H., Hibiuro T., Tanaka K. and Shibata D.** 1994. A novel lipoxygenase from rice. Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J. Biol. Chem.* **269**: 3755-3761.
- Penninckx I.A.M.A., Thomma B.P.H.J., Buchala A., Métraux J.P. and Broekaert W.F.** 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathway is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 2103-2113.
- Penninckx I., A.M.A., Eggermont K., Terras F.R.G., Thomma B.P.H.J., de Samblanx G.W., Buchala A., Métraux J.P., Manners J.M. and Broekaert W.F.** 1996. Pathogen-induced systemic activation of plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323.
- Ponce de León I., Sanz A., Hamberg M. and Castresana C.** 2002. Involvement of the *Arabidopsis*  $\alpha$ -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J.* **29**: 61-72

- Pontier D., Balagué C. and Roby D.** 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris Serie III - Sciences de la Vie* **321**: 721-734.
- Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vicente J., Rodriguez M.J., Kift N., Carbonne F., Griffiths G., Esquerré-Tugayé M.T. and Rosahl S.** 2005. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.* **139**: 1902–1913.
- Pruss, G.J., Nester, E.W. and Vance, V.** 2008. Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**:1528-1538.
- Pugin A., Frachisse J.M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R. and Guern J.** 1997. Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* **9**: 2077-2091.
- Rancé I., Fournier J. and Esquerré-Tugayé M.T.** 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6554-6559.
- Reymond P. and Farmer E.E.** 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Cur. Opin. Plant Biol.* **1**: 404-411.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.C., Sallantin M., Bauvais-cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G. and Pernellet J.C.** 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* **183**: 555-563.
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T. and Symons M.C.R.** 1991. Techniques in free radical research. In Burdon, R. H. and van Knippenberg, P. H. eds., *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. 291p.
- Rickauer M., Brodschelm W., Bottin A., Véronési C., Grimal H. and Esquerré-Tugayé M.T.** 1997. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta* **202**: 155-162.
- Riker A.J.** 1926. Studies on the influence of some environmental factors on the development of crown gall. *J. Agric. Res.* **32**: 83–96.
- Rolfs F.M.** 1935. Dissemination of the bacterial organism. *Phytopathology* **25**: 971.
- Rosahl S.** 1996. Lipoxygenase in plants. Their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.* **51c**: 123-138.
- Roy S., Pouénat M.L., Caumont C., Cariven C., Prevost M.C. and Esquerré-Tugayé M.T.** 1995. Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Sci.* **107**: 17-25.
- Roy P., Roy, S.K., Mitra A. and Kulkarni A.P.** 1994. Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochim. et Biophys. Acta* **1214**, 171-179.
- Royo J., Leon J., Vancanneyt G., Albar J.P., Rosahl S., Ortego F., Castanera P. and Sánchez-Serrano J.J.** 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.
- Rustérucchi C., Blein J.P., Stallaert V., Ducruet J.M., Pugin A. and Ricci P.** 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* **111**: 885-891.
- Rustérucchi C., Montillet J.L., Agnel J., P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J., J Etienne P., Suty L., Blein J.P. and Triantaphylidès C.** 1999. Involvement of

- lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **274**: 36446-36455.
- Ryu S.B.** 2004. Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends Plant Sci.* **9**: 229-235.
- Sandstrom P., A., Pardi D., Tebbey P.W., Dudek R.W., Terrian D.M., Folks T.M. and Buttke T.M.** 1995. Lipid hydroperoxide-induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression. *FEBS Lett.* **365**: 66-70.
- Sanier C.** 2008. Activation de la voie des oxylipines chez le cotonnier en réponse à la bactériose. Mise en évidence d'une 13-lipoxygénase induite lors de l'interaction incompatible *Gossypium hirsutum* avec *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* et lors de traitements hormonaux. Mémoire de Master 2: Université de Montpellier 2.
- Sano H. and Ohashi Y.** 1995. Involvement of small GTP-Binding proteins in defense signal-transduction pathways of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4138-4144.
- Saunders J.H. and Innes N.L.** 1963. The genetics of bacterial blight resistance on cotton : further evidence on the gene B6m. *Genet. Res.* **4**: 382-388.
- Sayegh-Alhambia M., Marmey P., Jalloul A., Champion A., Petitot A.S., Clériveret A. and Nicole M.** 2008. The lipoxygenase response is associated with resistance of various cotton genotypes to the bacterial blight disease. *J. Phytopathol.* **156**: 542-549.
- Schaller F., Schaller A. and Stinzi A.** 2005. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* **23**: 179-199.
- Schenk P., M., Kazan I., Wilson I. and erson J., P., Richmond T., Somerville S., C. and Manners J., M.** 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 11655-11660.
- Schnathorst W.C., Halisky P.M. and Martin R.D.** 1960. History, distribution, races and disease cycle of *Xanthomonas malvacearum* in California. *Plant Dis. Rep.* **44**: 603-608.
- Schweizer P., Buchala A. and Métraux J.P.** 1997. Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2:6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiol.* **115**: 61-70.
- Scofield S.R., Tobias C., M., Rathjen J.P., Chang J.H., Lavelle D.T., Michelmore R.W. and Staskawicz B.J.** 1996. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**: 2063-2065.
- Sembdner G. and Parthier B.** 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonate. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 569-589.
- Seo S., Sano H. and Ohashi Y.** 1999. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco Mitogen-Activated Protein Kinase. *Plant Cell* **11**: 289-298.
- Seo H.S., Song J.T., Cheong J.J., Lee Y.H., Lee Y.W., Hwang I., Lee J.S. and Choi Y.D.** 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4788-4793
- Sessa G. and Martin G.B.** 2000. Protein Kinases in the plant defense response. *Adv. Bot. Res.* **32**: 378-404.
- Shah J.** 2005. Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 229-260.
- Sharan M., Taguchi G., Gonda K., Jouke T., Shimosaka M., Hayashida N. and Okazaki M.** 1998. Effets of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scoplin in tobacco cell cultures. *Plant Sci.* **132**: 13-19.
- Sharma N., Gruszewski H.A., Park S.W., Holm D.G. and Vivanco J.M.** 2004. Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 647-655.

- Sharma V.K., Monostori T., Gobel C., Hansch R., Bittner F., Wasternack C., Feussner I., Mendel R.R., Hause B. and Schulze J.** 2006. Transgenic barley plants overexpressing a 13-lipoxygenase to modify oxylipin signature. *Phytochemistry* **67**: 264–276.
- Shirasu K., Nakajima H., Rajasekhar V.K., Dixon R.A. and Lamb C.** 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**: 261-270.
- Simon-Plas F., Rustérucchi C., Milat M.L., Humbert C., Montillet J.L. and Blein J.P.** 1997. Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ.* **20**: 1573-1579.
- Simpson T.D. and Gardner H.W.** 1995. Allene oxide synthase and allene oxide cyclase, enzymes of the jasmonic acid pathway, localized in *Glycine max* tissues. *Plant Physiol.* **108**: 199-202.
- Sinha P.P. and Verma J.P.** 1983. Role of phylloplane bacterial blight of cotton. *Int. J. Trop. Plant dis.* **1**: 125-128.
- Smith E.F.** 1920. Bacterial disease of Plants. Saunders Co, Philadelphia.
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E. and Levine A.** 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**: 431-443.
- Spoel S., Johnson J. and Dong X.** 2007. Regulation of tradeoffs between plant defense against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 18842–18847.
- Stakman E.C.** 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res.* **4**: 193-199.
- Staskawicz B., Dahlbeck D., Keen N. and Napoli C.** 1984. Cloned avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycines max* L. Merr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6024-6028.
- Stelmach B.A., Müller A., Hennig P., Gebhardt S., Schubert-Zsilavec M. and Weiler W.** 2001. A novel class of oxylipins, sn1-O-12-oxophytodienoyl.-sn2-O-hexadecatrienoyl.-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**: 12832-12838.
- Stintzi A., Weber H., Reymond P., Browse J. and Farmer E.E.** 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 12837-12842.
- Stoughton R.H.** 1933. The influence of environmental conditions on the development of the angular leaf spot disease of cotton. 5. The influence of alternating and varying conditions on infection. *Ann. Appl. Biol.* **20**: 590-611.
- Stumpe M., Kandzia R., Gobel C., Rosahl S. and Feussner I.** 2001. A pathogen-inducible divinyl ether synthase CYP74D. from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Lett.* **507**: 371-376.
- Stumpe M., Gobel C., Demchenko K., Hoffmann M., Klosgen R.B., Pawlowski K. and Feussner I.** 2006. Identification of an allene oxide synthase CYP74C. that leads to formation of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *Plant J.* **47**: 883–896.
- Tang X., Frederick R., D., Zhou J., Halterman D.A., Jia Y. and Martin G.B.** 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**: 2060-2063.
- Tarr S.A.J.** 1958. Seed treatment of cotton against diseases and insect pests. *Out. Agric.* **2**: 168-77.
- Texier P.H.** 1996. Le coton oléagineux en Afrique. *Oléag. Corps Gras Lip.* **3**: 111-113.
- Thiers H.D. and Blanck L.M.** 1951. A histological study of bacterial blight of cotton. *Phytopathology* **1**: 499-510.
- Thulke O. and Conrath U.** 1998. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant J.* **14**: 35-42.

- Torres J.D.G., Jones M.A. and Dangl J.L.** 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens, *Plant Physiol.* 141: 373–378.
- Turk S.C.H.J., L.S., Melchers H., den Dulk-Ras A.J.A., Regensburg-Tuink and Hooykass. P.J.J.** 1991. Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains. Role of the VirA sensor protein. *Plant Mol. Biol.* 16: 1051–1059.
- Turner J.G., Ellis C. and Devoto A.** 2002. The Jasmonate Signal Pathway. *Plant Cell* 14: 153-164.
- Uren A.G., O'Rourke K., Aravind L.A., Pisabarro M.T., Seshagiri S., Koonin E.V. and Dixit V.M.** 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6: 961-967.
- Van Breusegem F. and Dat J.F.** 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* 141:404-411.
- Van der Fits L. and Memelink J.** 2000. ORCA3, a Jasmonate-Responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297
- Van der Hoorn R.A., Wulff B.B., Rivas S., Durrant M.C., van der Ploeg A., de Wit P.J. and Jones J.D.** 2005. Structure-function analysis of cf-9: a receptor-like protein with Extracytoplasmic leucine-rich repeats. *Plant Cell* 17: 1000-1015.
- Van Ginkel G. and Sevanian A.** 1997. Lipid peroxydation-induced membrane structural alterations. *Methods Enzymol.* 233: 273-288.
- Veena H., J., Doerge R.W., et Gelvin S., B.** 2003. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J.* 35: 219-236.
- Vellosillo T., Martinez M., Lopez M.A., Vincente J., Cacon T., Dolan L Hamberg M. and Castresana C.** 2007. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* 19: 831-846.
- Verma J.P.** 1986. Bacterial blight of Cotton. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Verma J.P. and Singh R.P.** 1970. Two new races of *Xanthomonas malvacearum* the cause of blackarm of cotton. *Cot. Grow. Rev.* 47: 203-205.
- Verma J.P. and Singh R.P.** 1971a. Epidemiology and control of bacterial blight of cotton. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* 74: 326-331.
- Verma J.P. and Singh R.P.** 1971b. Pectic and cellulolytic enzymes of *Xanthomonas malvacearum* and the incidence of bacterial blight of cotton. *Curr. Sci.* 40: 21-22.
- Verma J.P. and Singh R.P.** 1974a. Studies on the nutrition of *Xanthomonas malvacearum* and its relationship to the free amino acids, organic acids and sugars of resistant and susceptible cotton cultivars. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 9: 55-63.
- Verma J.P. and Singh R.P.** 1974b. Recent studies on the bacterial diseases of fibre and oil seed crops in India. *In: Current Trends in Plant Pathology.* Raychaurhuri, S.P. and Verma, J.P. eds. Lucknow University, India, 134-145.
- Verma J.P., Nayak M.L. and Singh R.P.** 1977. Survival of *Xanthomonas malvacearum* under North Indian conditions. *Ind. Phytopathol.* 30: 361-365.
- Verma J.P., Singh R.P. and Nayak M.L.** 1975. Laboratory evaluation of chemicals against *Xanthomonas malvacearum* the incidence of bacterial blight of cotton. *Ind. Phytopathol.* 28: 170-173.
- Verma J.P., Singh R.P., Chowdhury H.D. and Sinha P.P.** 1983. Usefulness of phylloplane bacteria in the control of bacterial blight of cotton. *Ind. Phytopathol.* 36: 574-577.

- Véronési C., Rickauer M., Fournier J., Pouénat M.L. and Esquerré-Tuguayé M.T.** 1996. Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. *Plant Physiol.* **112**: 997-1004.
- Véronési C., Pouénat M.L., Rickauer M. and Esquerré-Tuguayé M.T.** 1999. Regulation of lipoxygenase by methyl jasmonate and fatty acids. *C. R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie* **322**: 491-497.
- Vijyan P., Shockey J., Lévesque C.A., Cook R.J. and Browse J.** 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7209-7214.
- Vina D. and Granada G.A.** 1986. Evaluation of the production of certified cotton seed in relation to the incidence of angular leaf spot. *Rev. Plant Pathol.* **67**: 142.
- Vollenweider S., Weber H., Stolz S., Chételat A. and Farmer E.E.** 2000. Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* **24**: 467-476.
- Volksch B., Ullrich M. and Fritsche W.** 1993. Occurrence of antimicrobial activities of bacteria from soybean leaf spots. *J. Basic Microbiol.* **33**: 349-355.
- Voloudakis A., Marmey P., Jalloul A., Delannoy E., Martinez C. and Nicole M.** 2006., Expression of superoxide dismutase genes during interactions of cotton with *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **68**: 119-127.
- Walter D.R.W., Cowley T., Weber H. and Nashaat N.I.** 2006. Changes in oxylipins in compatible and incompatible interactions between oilseed rape and the downy mildew pathogen *Peronospora parasitica*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **67**: 268-273.
- Wang X.** 2004. Lipid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 329-336.
- Wang G.L., Ruan D.L., Song W.Y., Sideris S., Chen L., Pi L.Y., Zhang S., Zhang Z., Fauquet C., Gaut B.S., Whalen M.C. and Ronald P.C.** 1998. *Xa21D* encodes a receptor-like molecule with a Leucine-Rich Repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**: 765-779.
- Wang C., Zien C.A., Afithile M., Welti R., Hildebrand D.F. and Wang X.** 2000. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2237-2246.
- Ward H.M.** 1902. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust *Puccinia dispersa* Erikss.. *Ann. Bot.* **16**: 233-315.
- Wardman P.** 1993. Free radicals: nature's way of saying NO or molecular murder. *Gray Laboratory Annual Report*, 1-7.
- Wasternack C. and Parthier B.** 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* **2**: 302-306.
- Watanabe N. and Lam E.** 2005. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *J Biol. Chem.* **280**: 14691-14699.
- Weber H., Chételat A., Caldelari D. and Farmer E.E.** 1999. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**: 485-493.
- Weichert H., Stenzel I., Berndt E., Wasternack C. and Feussner I.** 1999. Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves – preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Lett.* **464**: 133-137.
- Weindling R.** 1948. Bacterial blight of cotton under conditions of artificial inoculation. *US Dep. Agr. Tech. Bul. N° 956*.
- White F.F., Yang B. and Johnson L.B.** 2000. Prospects for understanding avirulence gene function, *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 291-298.
- Wickens G.M.** 1956. Vascular infection of cotton by *Xanthomonas malvacearum* E.F. Smith. *Dow. Ann. Appl. Biol.* **44**: 129-37.
- Winston G.W.** 1990. Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In Alscher R. G. and Cumming J. R. eds., *Stress responses in plants: adaptation and*



- acclimatation mechanisms*. Wiley-Liss, New-York, pp. 57-86.
- Wojtaszek P.** 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**: 681-692.
- Wright R.J., Thaxton P.M., El-Zik K.M. and Patreson A.H.** 1996. D-subgenome bias of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* resistance genes in tetraploid *Gossypium* cotton. suggests that polyploid formation has created novel avenues for evolution. *Genetics* **149**: 1987.
- Wu G.S., Short B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C. and Shah D.M.** 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* **7**: 1357-1368.
- Wubben J.W., Callahan F.E., Hayes R.W. and Jenkins J.N.** 2009. Molecular characterization and temporal expression analyses indicate that the *MIC* Meloidogyne Induced Cotton. gene family represents a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton *Gossypium hirsutum* L. *Planta* **228**:111–123
- Xu H., Chang P.F., Liu D., Narasimhan M.L., Raghobhama K.G., Hasegawa P.M. and Bressan R.A.** 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**: 1077-1085.
- Yang Y., Shah J. and Klessig D.F.** 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Gene Dev.* **11**: 1621-1639.
- Yu L. and Lenardo M.J.** 2003. Immunology. The paracaspase connection. *Science* **302**: 1515-1516.
- Zabbai F., Jarosch B. and Schaffrath U.** 2004. Over-expression of chloroplastic lipoxygenase RCI1 causes PR1 transcript accumulation in transiently transformed rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **64**: 37 - 43.
- Zaninotto F., La Camera S., Polverari A. and Delledonne M.** 2006. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.* **141**: 379-383.
- Zhang H., Xu Q., Krajewska M., Xie Z., Fuess S., Kitada S., Pawłowski K., Godzik A. and Reed J.C.** 2000. BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2597-2602.

## **ANNEXES**

**Annexe 1 : Gènes de résistance chez les plantes, d'après Liu *et al.* 2007**

Gene	Host	Pathogen	protein type
<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	CC-NBS-LRR
<i>RPS5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	LZ-NBS-LRR
<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	CC-NBS-LRR
<i>RPP8/HRT</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	CC-NBS-LRR
<i>RPP13</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	CC-NBS-LRR
<i>RCY1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	CC-NBS-LRR
<i>RPP/HRT</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Turnip crinkle virus</i>	CC-NBS-LRR
<i>RPM1</i>	Tomato	<i>Pseudomonas syringae</i>	CC-NBS-LRR
<i>Prf</i>	Tomato	<i>Pseudomonas syringae</i>	CC-NBS-LRR
<i>I2</i>	Tomato	<i>Fusarium oxysporum</i>	CC-NBS-LRR
<i>Mi-1</i>	Tomato	<i>Meloidogyne javanica</i>	CC-NBS-LRR
<i>Mi-9</i>	Tomato	<i>Meloidogyne javanica</i>	CC-NBS-LRR
<i>Sw-5/Mi</i>	Tomato	<i>Tospovirus</i>	CC-NBS-LRR
<i>Rx2</i>	Potato	<i>PVX</i> (Potato X virus)	CC-NBS-LRR
<i>Gpa2/Rx1</i>	Potato	<i>Globodera pallida/PVX</i>	CC-NBS-LRR
<i>R1</i>	Potato	<i>Phutophthora infestans</i>	CC-NBS-LRR
<i>Mla1</i>	Barely	<i>Blumeria graminis</i>	CC-NBS-LRR
<i>Mla6</i>	Barely	<i>Blumeria graminis</i>	CC-NBS-LRR
<i>Mla12</i>	Barely	<i>Blumeria graminis</i>	CC-NBS-LRR
<i>Mla13</i>	Barely	<i>Blumeria graminis</i>	CC-NBS-LRR
<i>Pib</i>	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	CC-NBS-LRR
<i>Pi-ta</i>	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	CC-NBS-LRR
<i>Pi36</i>	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	CC-NBS-LRR
<i>Xa1</i>	Rice	<i>Xanthomona oryzae</i>	CC-NBS-LRR
<i>Rp1</i>	Maize	<i>Puccinia sorghi</i>	CC-NBS-LRR
<i>Dm3</i>	Lettuce	<i>Bremia lactucae</i>	CC-NBS-LRR
<i>Bs2</i>	Pepper	<i>Xanthomonas campestris</i>	CC-NBS-LRR
<i>Pm3b</i>	Wheat	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i>	CC-NBS-LRR
<i>Lr10</i>	Wheat	<i>Puccinia triticina</i>	CC-NBS-LRR
<i>Pl8</i>	Sunflower	<i>Plasmopara halstedii</i>	CC-NBS-LRR
<i>RPS4</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	TIR-NBS-LRR
<i>RPP1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	TIR-NBS-LRR
<i>Rpp10</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	TIR-NBS-LRR
<i>Rpp14</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	TIR-NBS-LRR
<i>RPP4</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	TIR-NBS-LRR
<i>RPP5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	TIR-NBS-LRR
<i>SSI4</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	TIR-NBS-LRR
<i>L6</i>	Flux	<i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR
<i>L, L1-L11, LH</i>	Flux	<i>Melampsora lin</i>	TIR-NBS-LRR
<i>M</i>	Flux	<i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR

<i>P</i>	Flux	<i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR
<i>P2</i>	Flux	<i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR
<i>Bs4</i>	Tomato	<i>Xanthomonas campestris</i>	TIR-NBS-LRR
<i>N</i>	Tobacco	Tobacco mosaic virus	TIR-NBS-LRR
<i>RRS1-R</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	WRKY-TIR- NBS-LRR
<i>Pi9</i>	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	NBS-LRR
<i>Pi2</i>	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	NBS-LRR
<i>Piz-t</i>	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	NBS-LRR
<i>Cre3</i>	Wheat	<i>Heterodera avenuae</i>	NBS-LRR
<i>Cre1</i>	Wheat	<i>Heterodera avenuae</i>	NBS-LRR
<i>I2C</i>	Tomato	<i>Fusarium oxysporum</i>	NBS-LRR
<i>Hero</i>	Tomato	<i>Globodera rostochiensis</i>	NBS-LRR
<i>Rpg1</i>	Barley	<i>Puccinia graminis</i>	Protein kinase
<i>RPP27</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	Receptor like protein
<i>Pto</i>	Tomato	<i>Pseudomonas syringae</i>	Ser/Thr protein kinase
<i>Xa21</i>	Rice	<i>Xanthomona oryzae</i>	LRR-Ser/Thr protein kinase
<i>Xa21D</i>	Rice	<i>Xanthomona oryzae</i>	LRR receptor- like protein
<i>Xa26</i>	Rice	<i>Xanthomona oryzae</i>	LRR receptor- like kinase
<i>RFO1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Receptor-like kinase
<i>Pi-d2</i>	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	B-lectin PK
<i>Cf-9</i>	Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM
<i>Cf-2</i>	Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM
<i>Cf-4</i>	Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM
<i>Hcr9-4E</i>	Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM
<i>Cf-2/5</i>	Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM
<i>Ve</i>	Tomato	<i>Verticillium dahliae</i>	LRR-TM
<i>Hs<sup>pro-1</sup></i>	Beet	<i>Heterodera schachtii</i>	LRR-TM
<i>Rpw8</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	TM-CC
<i>Mlo</i>	Barely	<i>Erysiphe graminis</i>	TM
<i>Xa5</i>	Rice	<i>Xanthomona oryzae</i>	TF II A Trans- cription factor
<i>Xa27</i>	Rice	<i>Xanthomona oryzae</i>	No homolog
<i>Xa13</i>	Rice	<i>Xanthomona oryzae</i>	Homolog of nodulin MtN3

# PRODUCTION SCIENTIFIQUE

## Publications

- Cacas, J.L., Marmey P., **Sayegh-Alhamdia M.**, Jalloul A., Rojas-Mendoza A., Clériveret A., Nicole M. et Montillet, J.L. 2008. Patatin-like genes are specifically expressed in cotton during *Xanthomonas campestris*-induced hypersensitive cell death. **Plant Cell Reports** 28: 155-164.
- Marmey P., Jalloul A., **Sayegh-Alhamdia M.**, Assigbetsé K., Voloudakis A., Champion A., Montillet J.L and Nicole M. 2007. Cloning of a 9-lipoxygenase involved in the signalling pathway of the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45: 596-606.
- Sayegh-Alhamdia M.**, Marmey P., Jalloul A., Champion A., Petitot A.S., Clériveret A. and Nicole M. 2008. The lipoxygenase response is associated with resistance of various cotton genotypes to the bacterial blight disease. **Journal of Phytopathology**, 156:542-549.

## Posters et communications

- Sayegh-Alhamdia M.**, Jalloul A., Marmey P., Champion A., Clériveret A. and Nicole M. 2006. Variabilité de la réponse «lipoxygénase» chez différents génotypes de cotonnier (*Gossypium hirsutum*) infectés par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*. **Congrès AUPELF**, Constantine (Algérie).
- Sayegh-Alhamdia M.**, Marmey P., Jalloul A., Champion A., Clerivet A., Essenberg M. and Nicole M. 2007. The lipoxygenase response is associated with resistance of various cotton genotypes to the bacterial blight. **XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sorrento (Italie), July 21-27
- Sayegh-Alhamdia M.**, Marmey P., Jalloul A., Champion A., Clerivet A., Essenberg M. & Nicole M. 2008. The lipoxygenase response is associated with resistance of various cotton genotypes to the bacterial blight. **8ème Rencontres Plantes-Bactéries**, Aussois, January 14-18
- Champion A., Marmey P., **Sayegh-Alhamdia M.**, Clerivet and Nicole M. 2008. Genome-wide analysis of the ERF gene family in cotton. **8ème Rencontres Plantes-Bactéries**, Aussois, January 14-18.
- Champion A., Marmey P., **Sayegh-Alhamdia M.**, Clerivet A et Nicole M. 2007. Genome-wide analysis of the ERF gene family in cotton. **XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sorrento (Italie), July 21-25.
- Marmey P., **Sayegh-Alhamdia M.**, Petitot A.S., Jalloul A., Montillet J.L et Nicole M. 2005. Implications de deux gènes lipoxygénases dans la réaction hypersensible du cotonnier *Gossypium hirsutum* à *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. **VIème Congrès National Société Française de Phytopathologie**, Toulouse, 23-25 Février
- Marmey P., Cacas J.L., Jalloul A., **Sayegh-Alhamdia M.**, Champion A., Clériveret A., Montillet J.L. and Nicole M. 2007. Patatin and lipoxygenase coordinated activities in the hypersensitive reaction of *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*. **Congrès Molecular Plant-Microbe Interaction**. Turin (Italie).

## LISTE DES ABREVIATIONS

12-OH-JA : 12-acide hydroxyjasmonique  
ABA: Acide abscissique  
acd: Accelerated cell death  
ACS: acétyl-CoA synthétase  
ACX: acyl-CoA oxydase  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
AG : Acide gras  
AGPI : Acide gras polyinsaturé  
AOC : Allène oxyde cyclase  
AOS : Allène oxyde synthase  
ARN : Acide ribonucléique  
AS : Acide salicylique  
ATP : Adénosine triphosphate  
Avr : Avirulence  
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2  
BTH : Benzothiodiazole  
BSA: bovine serum albumine  
C16:1 : Acide hexadécénoïque  
C16:3 : Acide hexadécatriénoïque  
C18:1 : Acide oléique  
C18:2 : Acides linoléique  
C18:3 : Acide linoléique  
C20:4 : Acide arachidonique  
CA : Acide colnélique  
CHS : Chalcone synthase  
CnA : Acide colnélique  
coi1 : Coronatine Insensitive 1  
Ct: Cycle Threshold  
DES: Divinyl ether synthase  
dnd: Defense no death  
DOX: Dioxygénase  
DPI: Diphénylène iodonium  
EAO: Espèce activée de l'oxygène  
**EDTA Acide Ethylène Diamine Tétracétique**  
ERF : Ethylen Reponsive Factor  
ET : Ethylène  
H (P) ODE: acide hydro(pero)xyoctadécadiénoïque  
H (P) OTE: acide hydro(pero)xyoctadécatriénoïque  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
hpi : heure post-inoculation  
HPL : Hydroperoxyde lyase  
HPO : Hydroxyde  
HPX : Hydroperoxyde  
HR: Hypersensitive response  
hrp: Hypersensitive reaction and pathogenicity  
Gh: *Gossypium hirsutum*  
GFP: Green Fluorescent Protein

GUS: gène de la  $\beta$ -glucuronidase,  
 IL : Interleukin 1  
 JA: Acide jasmonique  
 jar1: Jasmonate resistant 1  
 Jaz: Jasmonate ZIM domain  
 jin1: Jasmonate insensitive1  
 JMT: acide jasmonique carboxyle methyl transférase  
 jpi : jour post-inoculation  
 KAT: 3-ketoacyl-CoA thiolase  
 Kb: Kilobases ou kilo-paire de base  
 KOD (T) E: Acide oxo-octadécadi(tri)-énoïque  
 L•: Radical lipidique  
 L'•: Radical alkyle  
 LA: Acide linoléique  
 LAH: Lipide acyle-hydrolase  
 LAR: Local Acquired Resistance  
 LeA: Acide linoléique  
 LMM: Lesion-Mimic Mutants  
 LO•: Radical alkoxy  
 LOO•: Radical peroxy  
 LOOH: Hydroperoxyde lipidique  
 LOX: Lipoxygénase  
 LRR: Leucine-rich repeat  
 Lsd: Lesion stimulating disease resistance response  
 LZ : Leucine zipper  
 MCP : Mort cellulaire programmée  
 MDA : Malondialdéhyde  
 MeJA : Methyl jasmonate  
 MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol  
 MFP : protéine multifonctionnelle  
 MU : méthylumbelliférol  
 MUG : méthylumbelliféryl- $\beta$ -D- glucuronide  
 NAD(P) : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)  
 NAD(P) H : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
 NBS: Nucleotide-binding site  
 NO: Nitric oxide  
 O<sub>2</sub>: Oxygène singulet  
 O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Anion superoxyde  
 OH<sup>-</sup> : Anion hydroxyl  
 OH: Radical hydroxyle  
 OH•: Radical hydroxyle  
 OPC: acide 8, 3-oxo-2-pentenyl-cyclopentane-1-octanoïque  
 OPDA: acide 12-oxo-10,15-octadécatriénoïque  
 OPR: OPDA reductase  
 PAL: Phenylalanine Ammonium Lyase,  
 PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern  
 PCR: réaction de polymérisation en chaîne  
 phox : Phagocyte oxydase  
 PIOX: Pathogen-induced oxygenase  
 PLA: Phospholipase A  
 PL, phospholipase

pmr4: Powdery mildew resistant 4  
POX: Peroxygénase  
PR: Pathogenesis-related  
PRR: Pattern Recognition Receptors  
PTI: Pathogen-Triggered Immunity  
Q-PCR: Quantitative PCR  
R : Résistance  
RES: Reactive electrophile species  
RH: Réponse hypersensible  
RNAi: Ribonucleic acid interference  
ROS: Reactive oxygen species  
SAR: systemic acquired resistance  
SIS: SA-Independent, Systemically induced genes  
SLS: Laurylsarcosine  
SOD: Superoxyde dismutase  
SRA: Systemice acquise résistance  
TIR: Toll-interleukin Receptor  
TTSS : Type III secretion system  
TFSS: Type IV secretion system  
VMT : Virus de la mosaïque du tabac  
WIPK : Wound induced protein kinase  
*Xcm* : *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*



# A novel patatin-like protein from cotton plant, GhPat1, is co-expressed with GhLox1 during *Xanthomonas campestris*-mediated hypersensitive cell death

Jean-Luc Cacas · Philippe Marmey · Jean-Luc Montillet · Majd Sayegh-Alhambia · Aida Jalloul · Ana Rojas-Mendoza · Alain Clériveret · Michel Nicole

Received: 3 July 2008 / Revised: 12 September 2008 / Accepted: 22 September 2008 / Published online: 11 October 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** In cotton plant, *Xanthomonas*-induced hypersensitive response (HR) is accompanied by a lipid peroxidation process involving a 9-lipoxygenase (LOX), GhLox1. Initiation of this oxidative metabolism implies the release of the LOX substrates, or polyunsaturated fatty acids. Since patatin-like proteins (PLPs) are likely candidates for mediating the latter step, we searched for genes encoding such enzymes, identified and cloned one of them that we named *GhPat1*. Biochemical and molecular studies showed that *GhPat1* expression was up-regulated during the incompatible interaction, prior to the onset of the

corresponding galactolipase activity and cell death symptoms in tissues. Protein sequence analysis and modelling also revealed that GhPat1 catalytic amino acids and fold were conserved across plant PLPs. Based on these results and our previous work (Jalloul et al. in Plant J 32:1–12, 2002), a role for GhPat1, in synergy with GhLox1, during HR-specific lipid peroxidation is discussed.

**Keywords** Patatin-like protein · Galactolipase · Lipoxygenase · Lipid peroxidation · Hypersensitive response · Programmed cell death

Jean-Luc Cacas and Philippe Marmey have contributed equally to this work.

Communicated by Leandro Peña.

J.-L. Cacas (✉) · P. Marmey · M. Sayegh-Alhambia · M. Nicole  
UMR RPB (Résistance des Plantes aux Bioagresseurs), IRD,  
B.P. 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France  
e-mail: cacasjl@yahoo.fr

J.-L. Montillet  
DSV-DEVM, Laboratoire des Echanges Membranaires &  
Signalisation, Cadarache, CEA, 13108 Saint-Paul-Lez Durance  
Cedex, France

A. Jalloul  
Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy,  
University of Damascus, Damascus, Syria

A. Rojas-Mendoza  
Structural Bioinformatics Group, Centro Nacional de  
Investigaciones Oncológicas, C/Melchor Fernandez Almagro, 3,  
28029 Madrid, Spain

A. Clériveret  
UMR RBP, Université Montpellier II,  
34095 Montpellier Cedex 5, France

## Abbreviations

CE	Cotton patatin-like EST
DAD1	Defective in anther dehiscence 1
DGL	DONGLE
FAH	Fatty acid hydroperoxide
HR	Hypersensitive response
LAH	Lipid acyl-hydrolase
LOX	Lipoxygenase
PCD	Programmed cell death
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLP	Patatin-like protein
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
TMV	Tobacco mosaic virus
<i>Xcm</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>

## Introduction

Programmed cell death (PCD) is a genetically controlled process, widely conserved across kingdoms, the purpose of which is the fitness of cellular communities and higher organisms. PCD is developmentally regulated, but can also

be induced in response to stress (Lewis 2000; Ameisen 2002; Diamond and McCabe 2007). To cope with pathogen attacks, plants have evolved numerous defence mechanisms including hypersensitive response (HR), whose appearance at the macroscopic level is characterized by a rapid host cell death restricted to the infection site. It is now commonly admitted that hypersensitive cell death is a form of PCD associated with plant resistance to biotrophic pathogens (Mur et al. 2008).

Among mechanisms that were identified during HR is the activation of the lipoxygenase (LOX) pathways. LOXs catalyse the introduction of molecular oxygen into polyunsaturated fatty acids (PUFAs) to produce hydroperoxides (Montillet et al. 2004). Induction of LOX expression and activity was reported in various plant/pathogen interactions (Melan et al. 1993; Véronesi et al. 1996; Kolomiets et al. 2000; Jalloul et al. 2002). Consistently, accumulation of fatty acid hydroperoxides (FAHs) and their derivatives, both referred to as oxylipins, was evidenced in this specific context (Montillet et al. 2002; Göbel et al. 2002; Hamberg et al. 2003; Andersson et al. 2006). In a general manner, due to their cognate antimicrobial and/or defence gene activating properties, oxylipins are thought to participate to plant immune reaction associated with HR (Blée 2002; Alméras et al. 2003; Prost et al. 2005). However, some of them also exhibit cytotoxic activities (Rustérucchi et al. 1999; Vollenweider et al. 2000; Knight et al. 2001; Davoine et al. 2005) and might, therefore, contribute to the execution of hypersensitive cell death.

In a previous work, we characterized lipid peroxidation upon inoculation of upland cotton cotyledons (*Gossypium hirsutum* cv. Reba B50) with the bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*). We established that a massive FAH accumulation dependent on 9-LOXs was setting up in tissues in parallel with the course of HR symptoms. Onset of the 9(*S*)-LOX activity was preceded by the transient rise of *GhLox1* transcript steady-state level (Jalloul et al. 2002). Cloning of the *GhLox1* cDNA and analysis of the deduced protein sequence revealed that amino acids at the Sloane's positions were specific of a 9-LOX enzyme (Marmey et al. 2007). In cryptogein-elicited tobacco leaves, a similar oxidative metabolism has been described (Rustérucchi et al. 1999). For this specific model, it was additionally shown that PUFAs originating mainly from plastid galactolipids were intensively consumed. The latter event was also preceded by a significant increase in free PUFA concentration. These observations led the authors to hypothesize the implication of galactolipases in providing free PUFAs from chloroplast membranes to the 9(*S*)-LOX.

As lipid acyl-hydrolases (LAHs), patatin-like proteins (PLPs) do not hydrolyse triglycerides. They possess, nevertheless, a large spectrum of substrates including both

phospholipids and glycolipids (Andrews et al. 1988; Strickland et al. 1995; Dhondt et al. 2000; Matos et al. 2001, 2008; Rietz et al. 2004; La Camera et al. 2005). In tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves, three out of four genes coding for PLPs, *NtPat1-3*, were found to be rapidly induced (Dhondt et al. 2000). Interestingly, two of the corresponding recombinant proteins were shown to display not only a phospholipase A<sub>2</sub> activity, but also a galactolipase one (Dhondt et al. 2000; Heitz et al. 2004). It was also reported that expression of *NtPat1-3* genes was followed by the induction of a galactolipase activity upon cryptogein treatment and inoculation of the avirulent strain of *Ralstonia solanacearum* (Cacas et al. 2005). In these conditions, it was further demonstrated that expression of patatin-like and 9-LOX genes, as well as galactolipase and 9(*S*)-LOX activities, were regulated in a co-ordinated manner. Taking into account this set of results, one can assume that PLPs, by releasing plastid PUFAs, initiate the 9-LOX pathway during tobacco HR.

The striking conservation of HR-associated lipid peroxidation in tobacco and cotton plants prompts us to investigate the putative involvement of cotton PLPs in this context. Expression profiles of patatin-like ESTs from *G. hirsutum* were compared upon inoculation with virulent and avirulent *Xcm* races. In accordance with the working hypothesis, increase in steady-state levels of two ESTs followed by the onset of a galactolipase activity in tissues undergoing HR was evidenced. The full-length cDNA corresponding to one of these ESTs was cloned and the deduced protein sequence analysed. Lastly, a role for PLPs in cotton HR is proposed.

## Materials and methods

### Plant material, bacterial strains and inoculation

Analysis was carried out on cotton plants, *G. hirsutum* cv. Reba B50 (Allen × Stoneville 2B), which is similar to the 101-102 B line and contains the B<sub>2</sub>B<sub>3</sub> R-genes conferring resistance to race 18 of *Xcm*. This cotton genotype is susceptible to race 20 (Innes 1983; Hillocks 1992). Plants were grown in a greenhouse under natural light and 30/25°C light/dark cycles with relative humidity averaging 80%. Races 18 and 20 of *Xcm* were maintained at 30°C on YPG agar medium (0.5% w/v yeast extract, 0.5% w/v bacteriological peptone, 0.5% w/v glucose as carbon source and 1.5% w/v agar, pH 5.0). Bacteria for inoculation were grown in 150 ml YPG medium at 30°C under vigorous shaking (150 rpm, TH30 incubator, Edmund Bühler). After approximately 18 h of growth, cultures were washed twice and resuspended in sterile water to reach a bacterial density of 10<sup>8</sup> CFU/ml. The suspension, or sterile water as

control, was then infiltrated onto the abaxial sides of 10 day-old cotyledons using a needleless syringe.

#### Lipase and galactolipase assays

Galactolipase and lipase activities were assayed using an indirect spectrophotometric assay according to Cacas et al. (2005). Lipid substrates, dilinoleoyl-monogalactosyldiglycerol and trilinolein, were respectively purchased from Serdary (Interchim, Mont Luçon, France) and Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France).

#### Relative reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA were extracted from *Xcm*-infected and water-infiltrated cotyledons as described by Corre et al. (1996) and reverse-transcribed (7.5 µg/sample) using the enzyme Stratascript (Stratagene, La Jolla, USA). The primers used for this step was an oligo(dT)<sub>18</sub>. Relative duplex PCR and product quantification were performed as previously described (Cacas et al. 2005). The following pairs of primers were used: *CE1*, forward, 5'-AGGGGGTATCAGAGGGCTTA-3' and reverse, 5'-TGCAAGGATGGCTTTTACC-3'; *CE2*, forward, 5'-CATAGCAACCTCAGCTGCAC-3' and reverse, 5'-TAATCCATGGGTTTCGTTGG-3'; *CE3*, forward, 5'-TCCGAACGAAAAGAATCGAC-3' and reverse, 5'-CTTAGTCCCAATGCGTTTGA-3'; *CE4*, forward, 5'-GCAAATTGACCGTGTTGTTG-3' and reverse, 5'-CCCTAAGTGACCACGAGCAT-3'; *CE5*, forward, 5'-TTGCTGCAAGAACATTCAC-3' and reverse, 5'-TTTTCCAGGCACCTTGATTC-3'; *CE6*, forward, 5'-CTTTGGCTTATCTCGAACACG-3' and reverse, 5'-TACATCCGCTTCCCATTCTC-3'. As internal control, an actin fragment (300 bp) was also co-amplified using the following primers: forward, 5'-ATTGTGAGCAAC TGGGATGA-3' and reverse, 5'-GTAGATGGGGACGGTGTGAG-3'. Linearity range in function of the template concentration and number of cycles were checked to insure the validity of the PCR conditions. *CE1* and *CE2* PCR products were also sequenced to check primer specificity.

#### Isolation and cloning of *GhPat1* cDNA

Full-length sequence of *GhPat1* was determined by rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR. The bacteriophage λ DNA used as template was extracted according to Santos (1991) from a cDNA library performed on Reba B50 cotyledons 5.5 h upon inoculation with *Xcm* race 18 (Delannoy et al. 2003). The 5'- and 3'-ends were respectively amplified using *CE1* reverse and SP6 primers, and *CE1* forward and T7 primers. The PCR reaction was

performed according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France) in a final volume of 25 µl containing 0.2 U of *Taq* DNA polymerase, 200 nM of each primer, 200 µM of each dNTP and 5 µl of a 50-fold diluted template. Amplification was performed with an initial denaturation step of 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation (30 s at 95°C), annealing (30 s at 50°C) and extension (1 min 30 s at 72°C). After the last cycle, PCR products were extended for 5 min at 72°C. To identify specific PCR products, nested primers were designed as following: *CE1*-Fnested, 5'-AAATTGCACCAGACCCTGAC-3' and *CE1*-Rnested, 5'-TCCAGGAATAAGCCCTCTGA-3'. A 25-fold dilution of the previous PCR products was then used as template for a second PCR run in the same conditions. Sequencing of nested PCR products allowed to determine the full-length *GhPat1* sequence. The cDNA was finally amplified by one-step PCR using a high fidelity DNA polymerase according to the manufacturer's instructions (*PfuTurbo*, Stratagene, La Jolla, USA) and the following pair of primers: *GhPat1*-Fc 5'-TCCCCCGGGGATTCTCACAAACCTTA-3' and *GhPat1*-Rc 5'-TGCTCTAGATGGATTAACGTCTACCGT-3'. It was cloned into *SmaI* restrictions sites in pBluescript II SK(+) plasmid (Stratagene, La Jolla, USA). Clones were finally sequenced before *GhPat1* cDNA submission to GenBank.

#### Prediction of *GhPat1* tertiary structure

The raw sequence of *GhPat1* was used as query to screen the protein data bank (PDB) by means of the BLAST algorithm. As expected, the best hit retrieved corresponded to the potato patatin Pat17 (PDB entry, 1OXW\_A), whose structure had already been determined by X-ray crystallography (Rydel et al. 2003). Considering the high structural identity within both proteins (50.33%), Pat17 was chosen as template for homology modelling. Pairwise alignments were conducted using DALI server (<http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/>) and manually curated. Models were then performed using the SwissModel program (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>; Schwede et al. 2003) and evaluated with WhatIF tool (<http://www.cmbi.kun.nl/gv/servers/>). Images were created with pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

## Results

#### Identification of patatin-like ESTs from cotton plant

Since the cotton genome is not sequenced, we searched cDNA libraries available online at the TIGR database (The Institute for Genomic Research, Cotton Gene Index;

<http://www.tigr.org/>) for patatin-like ESTs. We first applied the keywords “patatin” and “patatin-like” to screen the database. We then completed the search by means of the BLAST algorithm using as queries the previously identified sequences and those of characterized PLPs from *Nicotiana tabacum* (Drews et al. 1992; Dhondt et al. 2000) and *Arabidopsis thaliana* (Holk et al. 2002). On the whole, 11 ESTs were retrieved, seven from *G. hirsutum* and four from *G. arboreum* (Table 1). They were named cotton patatin EST (CE)1–11. Among them were two CE1, which showed 100% identity along 580 bp they shared. It is noteworthy that at the nucleotide level CE1-3 shared with their *Arabidopsis* homolog, PLP2, a 150 bp-long region of high identity (80–90%). Previously, it has been evidenced that AtPLP2 expression was stimulated following necrotrophic fungi inoculation and various abiotic stresses (Narusaka et al. 2003). More recently, using transgenic lines a positive correlation in between AtPLP2 level and hypersensitive cell death has been established (La Camera et al. 2005). Furthermore, by contrast to all other ESTs CE1-3 also presented a relatively high percentage of homology (around 70%) with their tobacco counterparts, NtPat1-3. Again, the latter genes were shown to be up-regulated during virus- and bacteria-induced HR (Dhondt et al. 2000; Cacas et al. 2005).

#### Expression patterns of patatin-like ESTs in response to *Xcm* bacteria

Cotton plant, *G. hirsutum* cultivar Reba B50, carrying the B<sub>2</sub>B<sub>3</sub> blight-resistance genes is resistant to *Xcm* race 18 whereas it develops disease in response to race 20 (Innes 1983; Hillocks 1992). In an attempt to identify candidate patatin-like genes specifically involved in HR, we compared by relative RT-PCR the expression patterns of CE1-6

in cotyledons infected with either of the two *Xcm* races. Using specific primers of CE3, CE5 and CE6, no amplification was observed during interactions and in control tissues infiltrated with water. However, we did get amplification of PCR fragments by using genomic DNA as template (data not shown). This strongly suggests that the gene(s) corresponding to this set of ESTs are not expressed in our experimental conditions. Another EST, CE4, displayed a constitutive steady-state level that remained unchanged throughout the time-course of the experiment (data not shown). On the other hand, CE1 and CE2 did show differential patterns of expression in between the two interactions (Fig. 1). In response to *Xcm* race 18, a significant increase in CE1 transcript level was monitored, beginning beyond 4 hpi and reaching a plateau as soon as 10 hpi. By contrast, in tissues inoculated with *Xcm* race 20, CE1 transcripts accumulated later and transiently with an optimum at 15 hpi. No transcripts were detected in controls. CE2 expression was constitutive and only stimulated in incompatible conditions. Compared to CE1, the rise in CE2 transcript level occurred later but faster, being significant and already maximum at 10 hpi. Altogether, these data suggest the involvement of CE1- and CE2-encoded PLPs in a key step of cotton HR.

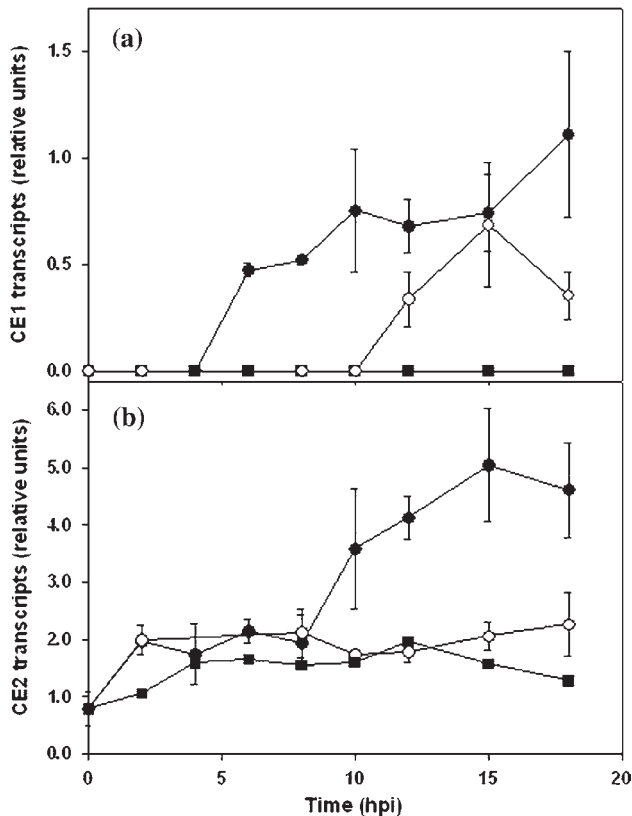
#### Onset of a galactolipase activity specific of cotton HR

Patatin-like proteins belong to the LAH class known to catalyse the deacylation of both galactolipids and phospholipids (Andrews et al. 1988; Strickland et al. 1995; Dhondt et al. 2000; Matos et al. 2001, 2008; Rietz et al. 2004; La Camera et al. 2005). We thus followed the kinetic evolution of galactolipase activity in cotyledons infiltrated either with the avirulent or virulent races of *Xcm* (Fig. 2). During the incompatible interaction, the galactolipase

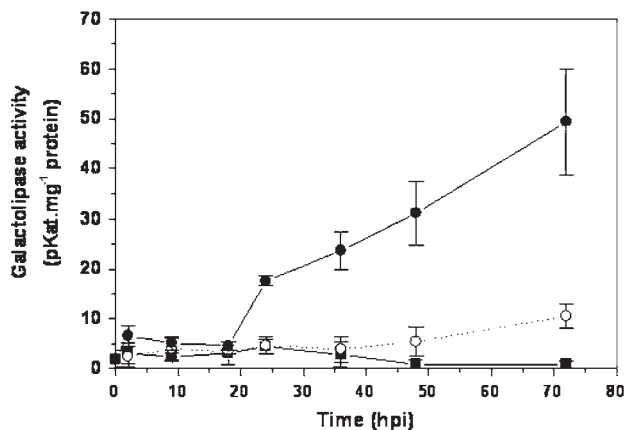
**Table 1** Nomenclature of patatin-like ESTs identified from *Gossypium hirsutum* (a) and *Gossypium arboreum* (b)

Designation	TIGR ref.	GI ref.	Length (bp)	Library ref.	Comments
(a) <i>Gossypium hirsutum</i>					
CE1	AI727007	5045859	604	6-Day cotton fiber (#1PK)	6-Day post anthesis immature fibbers, Acala Maxxa cultivar
CE1	AI727476	5046328	629		
CE4	AI731710	5050562	626	Cotton boll abscission zone (#1AH)	From Clemenson University Genomics Institute (CUGI)
CE3	AI055027	3326141	699		
CE2	AI055516	3326630	631		
CE5	AI055087	3326201	709		
CE6	AI055350	3326464	653		
(b) <i>Gossypium arboreum</i>					
CE7	BE052657	13245389	264	7–10 Days post anthesis fiber (#2DG)	Fibbers isolated from bolls
CE8	BG444707	13354359	901		
CE9	AW728182	7625752	1640		
CE10	AW730544	7628189	1991		

CE cotton patatin-like EST,  
TIGR The Institute for Genome  
Research, GI gene ID, ref.  
reference



**Fig. 1** Time-course changes in *CE1* (a) and *CE2* (b) expression in Reba B50 cotyledons infiltrated with *Xcm* race 18 (filled circles), race 20 (open circles) or water (filled squares) as control. Mean and SE of three independent analyses



**Fig. 2** Time-course evolution of galactolipase activity in Reba B50 cotyledons infiltrated with *Xcm* bacteria or water. Curve symbols are the same as those used in Fig. 1. Mean and SE of two independent analyses

activity started increasing beyond 18 hpi and kept on going until 72 hpi, where it reached about 50 pKat/mg proteins. A significant rise in enzymatic activity was also observed during the compatible interaction, but it occurred later (from 48 hpi) and the highest level ever measured (at

72 hpi) only represented one fifth of those recorded for the incompatible interaction. In control tissues, the galactolipase activity was barely detectable. Besides PLPs, certain lipases such as defective in anther dehiscence 1 (DAD1) and the related enzyme DONGLE are able to hydrolyse galactolipids (Ishiguro et al. 2001; Hyun et al. 2008). To assess the enzymatic specificity of our crude protein extracts, we therefore tested their ability to cleave trilinolein, a triglyceride commonly used to evidence lipase activity. In extracts prepared at several time points (24, 48 and 72 hpi) from tissues undergoing HR, no lipase activity was detected (data not shown). Collectively, these results along with the expression data presented above sustain the idea that *CE1*- and *CE2*-encoded PLPs might be responsible for at least part of the galactolipase activity induced during cotton HR.

#### Cloning of a patatin-like cDNA and analysis of the deduced protein sequence

Full-length transcript sequence corresponding to *CE1* was determined by nested RACE-PCR. Primers were then designed to amplify by one-step PCR and clone the cDNA in pBluescript II plasmid as described in the Sect. “Materials and methods”. Since it was the first cotton patatin cDNA cloned, it was named *GhPat1* (standing for *G. hirsutum Patatin-like 1*). The sequence deposited at GenBank (AY929163) includes a 44 bp-long 5'-UTR, a 1,302 bp-long ORF and a 223 bp-long 3'-UTR (Fig. 3). The calculated molecular weight of the deduced protein (434 amino acids) is 47.83 kDa. Its predicted isoelectric point is 6.89. No signal peptide was evidenced using ChloroP1.1 and Psort II softwares (Nakai and Kanehisa 1992; Emanuelsson et al. 1999), suggesting that *GhPat1*, like its *Arabidopsis* homolog *AtPLP2* (La Camera et al. 2005), resides in the cytoplasm.

Protein alignment revealed highly conserved regions in *GhPat1* sequence (Fig. 4), that match the four consensus blocks described for prokaryotic PLPs (Banerji and Flieger 2004) and an additional block (block V), evidenced by sequence comparison with human *cPLA<sub>2</sub>* (Hirschberg et al. 2001). Amino acids and motifs relevant or supposedly relevant for enzymatic activity and/or tertiary structure according to the latter studies were also identified (see legend of Fig. 4). Importantly, the position and nature of the catalytic dyad previously evidenced on potato patatin *Pat17* (Rydel et al. 2003) was found to be conserved in *GhPat1* primary structure : S79 and D230 in blocks II and IV, respectively.

To further strengthen our analysis, we built a structural model for *GhPat1* (see Sect. “Materials and methods” for details). The overall model and template structures appeared to match almost perfectly when superimposed



M E G I F K H I I T K F N F F T D S F R S F L Q	24
ATG GAA GGA ATT CCT AAA CAT ATT ATT ACA AAA TTC AAC TTC TTC ACA GAT AGC CCG AGA TCA CCT CTT CAA	72
F F T Y G N L I T L L S I D G G G I R G L I F G	48
CCT CCC ACA TAT GGG AAT TTG ATT ACT CTT CTT AGC ATT GAT GGA GGG GGT ATC AGA GGG CTT ATT CCT GGA	144
T L L A F L E S Q L Q K L D G E Q A R L A D Y F	72
ACT CTA CTT GCT TTT TTA GAG TCT CAG CTT CAG AAG CTG GAC GGT GAG CAA GCG AGA TTG GCT GAT TAT TTT	216
D I I S G T S T G G L V T A M L T T F D E K K E	96
GAT ATT ATT TCT GGG ACG AGC ACT GGT GGC CTC GTC ACT GCC ATG CTA ACT ACC CCA GAT CCC AAA AAA GAG	288
N R F L F A A K D I N E F Y L E H C F K I F F Q	120
AAT CGC CCT CTT TTT GCT GCC AAA GAT ATC AAT GAG TTC TAC CTT GAA CAC TGC CCT AAA ATC TTT CCC CAA	360
D S S F F A F A A N V V K S L M G F K Y D G K Y	144
GAT AGT TCT CCT TTT GCA CCA GCT GCA AAT GTG GTC AAA TCA CTA ATG GGA CCA AAA TAT GAC GGT AAA TAT	432
L H D I V R E K L G E T K L H Q T L T N V V I F	168
CTT CAT GAT ATT GTG AGG GAA AAG CTG GGA GAA AAT AAA TTG CAC CAG ACC CTG ACT AAC GTT GTG ATC CCA	504
T F D I K Q L Q F R I F S T Y E V K S H F C T D	192
ACT TTT GAC ATC AAG CAA CTC CAG CCA AGA ATA TTC TCC ACC TAT GAG GTA AAA AGC CAT CCT TGC ACC GAT	576
A L L S D I C I A T S A A F T Y L F A H H F Q T	216
GCT TTA CTG TCG GAT ATT TGC ATT GCA ACT TCA GCA GCT CCT ACT TAC CTT CCT GCC CAT CAT TTT CAA ACC	648
Q D S T G K T K E F N L I D G G V A A N N F T L	240
CAA GAT TCC ACT GGC AAA ACA AAA GAA TTC AAG CTT ATC GAT GGA GGG GTT GCT GCT AAT AAC CCG ACT TTA	720
V A M N E V T K E I L R G N F E F F F I K F T D	264
GTG GCT ATG AAC GAA GTG ACT AAA GAA ATA CTT CGA GGG AAT CCC GAA TTT TTT CCA ATA AAG CCC ACT GAC	792
Y A R F L V V S L G T G S F K S E G K Y H A N M	288
TAC GCT CGG TTC CTG GTT GTA TCT TTG GGG ACT GGT TCA CCC AAA TCA GAA GGG AAG TAC CAT GCT AAT ATG	864
T A K W G V L G W L T S E H S T F L V D I F M Q	312
ACA GCT AAA TGG GGA GTT TTG GGA TGG TTG ACC AGT GAG CAC TCT ACT CCT TTG GTG GAT ATT TTC ATG CAA	936
A S S D M V D F H I A T V F Q A L Q S E N S Y L	336
GCA AGC AGT GAC ATG GTC GAC TTT CAT ATT GCC ACC GTT TTT CAA GCC CTT CAA TCT GAA AAC AGT TAT CTC	1008
R I Q D D T L S Q Q I S S V D I A T K E N L E N	360
CGA ATT CAG GAT GAT ACA CTC TCT CAG CAA ATA TCA TCT GTG GAT ATT GCT ACC AAG GAA AAC CTT GAG AAC	1080
L V K V G E E L L K K F V S R V N L E N G Q F E	384
CTT GTG AAA GTC GGA GAA GAA TTG CTA AAA AAG CCT GTT TCC AGA GTG AAT TTG GAG AAT GGT CAA TTC GAA	1152
F A G K I T N G E A L I R L A A V L S K E K Q L	408
CCA GCT GGC AAG ATA ACC AAT GGA GAG GCT CTC ATC AGA TTA GCA GCA GTT CTT TCC AAG GAG AAG CAG CTT	1224
R D M R S F L G K L A M K K N E E C A H V N N T	432
CGT GAC ATG AGA TCA CCC CTT GGA AAA CTT GCG ATG AAG AAA AAT GAA GAA TGC GCT CAC GTT AAT AAT ACT	1296
T T *	435
ACC ACA TAA	1305

**Fig. 3** *GhPat1* full-length cDNA and the deduced protein sequence. Sequence *highlighted* corresponds to *CE1*. Protein and cDNA accession numbers are AAX99411 and AY929163, respectively

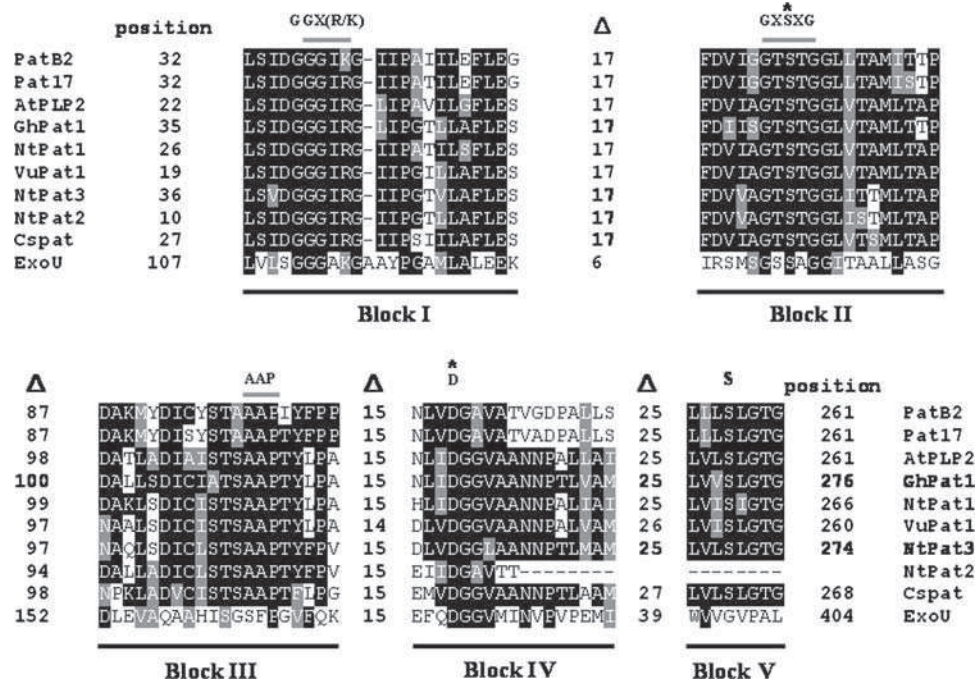
(data not shown), suggesting that GhPat1 fold topology is quite similar to that of Pat17. Accordingly, the central core of GhPat1 is distinct from that of the canonical  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold. It is organized as a six-stranded-sheet fold containing five parallel  $\beta$ -strands followed by one antiparallel strand (data not shown). The catalytic dyad, as well as the motif GGX(R/K) supposed to be involved in the substrate orientation and oxyanion stabilization in the catalytic pocket (Dessen et al. 1999), are all localized in a close vicinity (Fig. 5a). In addition, their positions in the predicted tertiary structure are well conserved with those of Pat17 (Fig. 5b).

Finally, phylogenetic analysis also showed that GhPat1 unrooted in a phylum composed of AtPLP2 and NtPat1

(Fig. 6), two PLPs whose galactolipase activity was experimentally demonstrated (Heitz et al. 2004; La Camera et al. 2005; Matos et al. 2008). In conclusion, our in silico analysis strongly suggests that *GhPat1* gene encodes a cytoplasmic PLP which is enzymatically active.

## Discussion

Here, we report the identification of eleven patatin-like ESTs from two cotton species, *G. hirsutum* and *G. arboreum*. In *Xcm*-infiltrated cotyledons, quantification of *CE1-6* concentrations revealed four different expression patterns, indicating that the genome of *G. hirsutum* cv. Reba B50



**Fig. 4** Partial alignment of PLPs showing consensus blocks previously described (Banerji and Flieger 2004; Hirschberg et al. 2001). Beside the alignment, numbers indicate amino acid positions in the protein sequences. Deletions in sequences are represented by open triangle symbols. Amino acids relevant or supposedly relevant for enzymatic activity and/or structure are represented above the alignment: the motif GGX(R/K) involved in the substrate orientation and oxyanion stabilization in cPLA<sub>2</sub> enzymes (Dessen et al. 1999); the lipase motif GXSSXG containing the catalytic serine (Rydel et al. 2003), the AAP pattern specific of eukaryotic PLPs (Banerji and

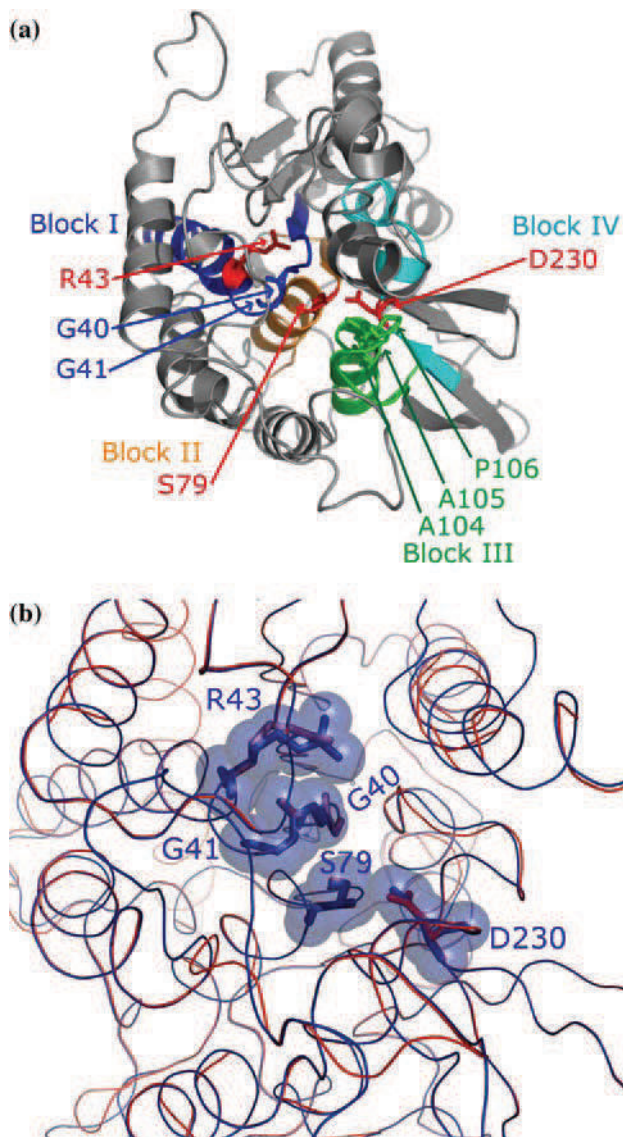
Flieger 2004) and the serine from the block V, crucial for the protein folding (Hirschberg et al. 2001). Catalytic dyad is indicated by asterisks. Origin and accession numbers of sequences are as following: *A. thaliana*, AtPLP2, NP\_180224; *Cucumis sativus*, Cspat, CAA73328; *N. tabacum*, NtPat1, AAF98368; NtPat2, AAF98370; NtPat3, AAF98369; *Solanum cardiophyllum*, Pat17, Q8LPW4; *S. tuberosum*, PatB2, P15477; *Vigna unguiculata*, VuPat1, AAK18751; *G. hirsutum*, GhPat1, AY929163 and *Pseudomonas aeruginosa*, ExoU, AAC16023

contains a patatin-like multigenic family composed of at least four distinct members. Among this set of ESTs are *CE1* and *CE2*, whose corresponding transcripts were found to accumulate significantly upon inoculation with *Xcm* race 18 (Fig. 1). In these conditions, *CE1* transcriptional response took place at 6 hpi, 2 h earlier than that of *GhLox1*, but was sustained until 18 hpi largely overlapping the *LOX* gene induction which optimum is reached in between 10 and 12 hpi (Jalloul et al. 2002; Marmey et al. 2007). The kinetic evolution of *CE2* expression was concomitant with that of *GhLox1*.

In the present study, we also established that transcription of *CE1* and *CE2* preceded the onset of a galactolipase activity which is specific of tissues undergoing HR (Figs. 1, 2). It seems likely that GhPat1 and another PLP are responsible for at least part of this activity. Our results along with data from the literature further support this assumption. The fact that no lipase activity was evidenced in our crude protein extracts implies that galactolipase enzymes involved in cotton hypersensitive cell death belong to the LAH class, as do PLPs. It also allows to rule out the contribution of lipases such as orthologs of DAD1

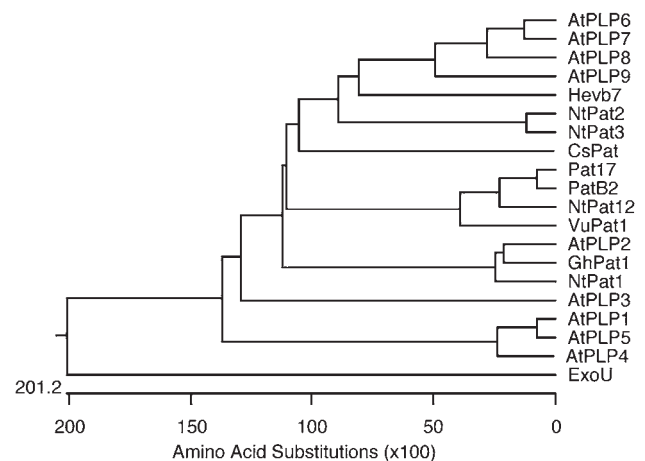
and DGL (Ishiguro et al. 2001; Hyun et al. 2008) to the galactolipase activity we measured. Moreover, several patatin-like genes from *A. thaliana* and *N. tabacum* were shown to be HR-responsive (Dhondt et al. 2000; Cacas et al. 2005; La Camera et al. 2005), and the encoded recombinant proteins (AtPLP2, NtPat1 and NtPat3) were all demonstrated to be able to hydrolyse galactolipids (Heitz et al. 2004; La Camera et al. 2005; Matos et al. 2008). Lastly, suppression of PLP2 protein expression using a RNAi approach fully abolished the constitutive galactolipase activity from *Arabidopsis* leaves (La Camera et al. 2005).

Whether PLPs act right upstream GhLox1 in the same metabolic pathway during HR, one would expect that these enzymes are submitted to a fine-tuned regulation at the spatio-temporal level. During the time-course of the incompatible interaction between *Xcm* and cotton plant, the profile of the 9(*S*)-LOX activity appeared to be biphasic; the second peak being closely correlated with FAH production and HR symptom development (Jalloul et al. 2002). In agreement with our working hypothesis, the timing of the galactolipase activity increase we observed (Fig. 2)



**Fig. 5** Structural models of GhPat1. **a** Ribbon-style figure of the GhPat1 monomer. Blocks I–IV, described in the previous figure, are indicated with colours. Catalytic residues and amino acids of the motif GGX(R/K) are labelled. **b**  $\alpha$ -Carbon superposition of the GhPat1 catalytic domain on Pat17. Template (PDB entry, 1oxw\_A) and model are represented in red and blue, respectively. The catalytic residues and amino acids of the motif GGX(R/K) are indicated as blue spheres

matched the second phase of the LOX induction. Interestingly, this physiological situation is quite similar to that reported in tobacco where activation of the PLPs/9-LOX couple was proposed to bring about PCD associated with HR (Cacas et al. 2005). In cotton plant, among the two PLPs that are likely partners of GhLox1 is GhPat1, for which we cloned the full-length cDNA (Fig. 3). The deduced protein sequence was found to possess the typical PLP catalytic dyad (Fig. 4). Modelling of the tertiary structure also indicated that position of the catalytic residues, as well as other



**Fig. 6** Plant PLP phylogenetic tree including GhPat1. The tree was built using TREEVIEW software (Page 1996) upon protein sequence alignment by means of the ClustalW method (DNASTar software, Madison, USA). Origin and accession numbers of sequences, except for those mentioned in the legend of Fig. 4, are as following: *A. thaliana*, AtPLP1, NP\_849512, AtPLP3, NP\_195422, AtPLP4, NP\_199172, AtPLP5, NP\_195423, AtPLP6, NP\_181455, AtPLP7, NM\_191055, AtPLP8, NP\_194709, AtPLP9, NP\_567142; *Hevea brasiliensis*, Hevb7, AAF25553 and *N. tabacum*, NtTP12, AAB08428

amino acids supposed to contribute to the substrate orientation in the catalytic pocket, could be conserved with that of Pat17 (Fig. 5), suggesting that GhPat1 is enzymatically active. Importantly, no signal peptide was predicted in GhPat1 sequence, implying a subcellular localization in the cytoplasm. Plant LOXs exhibiting a 9-regiospecificity are all thought to reside in this cell compartment (Feussner and Wasternack 2002). GhLox1 is indeed devoid of any targeting sequence. The presumed co-localization of GhPat1 and GhLox1 in the cytoplasm, along with our biochemical analysis, therefore argues for a co-ordinated action of both enzymes during cotton HR.

Taking into account all data presented above, we propose that (1) GhPat1, and another PLP corresponding to CE2, participate to PUFA mobilization from chloroplast membranes, thereby initiating the 9-LOX-dependent peroxidation process that accompanies cotton HR, and (2) at least the starting point of this oxylipin pathway, requiring the combined action of PLPs and LOXs, is conserved within cotton and tobacco plants. To strengthen our hypothesis, production of the recombinant protein GhPat1 and analysis of its substrate specificity are envisaged. Suppression of *GhPat1* and *GhLox1* expression using a transient RNAi system should also help to ascertain the role(s) fulfilled by this couple of enzymes during hypersensitive cell death in cotton plant.

**Acknowledgements** We wish to warmly thank E. Delannoy for his help and stimulating discussions. We also thank J. Aribi for technical assistance in the greenhouse work.



## References

- Alméras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, M ne-Saffrané L, Farmer EE (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 34:205–216
- Ameisen JC (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9:367–393
- Andersson MX, Hamberg M, Kourtchenko O, Brunnstr m A, McPhail KL, Gerwick WH, Göbel C, Feussner I, Ellerstr m M (2006) Oxylin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *J Biol Chem* 281:31528–31537
- Andrews DL, Beames B, Summers MD, Park WD (1988) Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J* 252:199–206
- Banerji S, Flieger A (2004) Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* 150:522–525
- Bl e E (2002) Impact of phyto-oxylin in plant defense. *Trends Plant Sci* 7:315–322
- Cacas JL, Vaill au F, Davoine C, Ennar N, Agnel JP, Tronchet M, Ponchet M, Blein JP, Roby D, Triantaphylidès C, Montillet JL (2005) The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant Cell Environ* 28:1367–1378
- Corre F, Henry Y, Rode A, Hartmann C (1996) *Em* gene expression during somatic embryogenesis in the monocot *Triticum aestivum* L. *Plant Sci* 117:139–149
- Davoine C, Douki T, Iacazio G, Montillet JL, Triantaphylidès C (2005) Conjugation of keto fatty acids to glutathione in plant tissues. Characterization and quantification by HPLC-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 77:7366–7372
- Delannoy E, Jalloul A, Assigbetsé K, Marmey P, Geiger JP, Lherminier J, Daniel JF, Martinez C, Nicole M (2003) Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1030–1038
- Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS (1999) Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 97:349–360
- Dhondt S, Geoffroy P, Stelmach BA, Legrand M, Heitz T (2000) Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J* 23:431–440
- Diamond M, McCabe PF (2007) The role of mitochondria in plant programmed cell death. In: Logan DC (ed) *Plant mitochondria* (annual plant reviews series), vol 31. Blackwell Publishing, Oxford, pp 308–335
- Drews GN, Beals TP, Bui AQ, Goldberg RB (1992) Regional and cell-specific gene expression patterns during petal development. *Plant Cell* 4:1383–1404
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8:978–984
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53:275–297
- Göbel C, Feussner I, Hamberg M, Rosahl S (2002) Oxylin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim Biophys Acta* 1584:55–64
- Hamberg M, Sanz A, Rodriguez MJ, Calvo AP, Castresana C (2003) Activation of the fatty acid  $\alpha$ -dioxygenases pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylin protecting against cell death. *J Biol Chem* 278:51796–51805
- Heitz T, La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Geoffroy P, Legrand M (2004) Pathogen-induced lipid acyl hydrolases and oxylin metabolism. In: The international joint workshop on PR-proteins and induced resistance, Hotel Marientyst, Elsinore, Denmark, 5–9 May 2004
- Hillocks RJ (1992) *Cotton diseases*. CAB International, Wallingford, pp 39–85
- Hirschberg HJ, Simons JFA, Dekker N, Egmond MR (2001) Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur J Biochem* 268:5037–5044
- Holk A, Rietz S, Zahn M, Quader H, Scherer GF (2002) Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis thaliana* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol* 130:90–101
- Hyun Y, Choi S, Hwang HJ, Yu J, Nam SJ, Ko J, Park JY, Seo YS, Kim EY, Ryu SB, Kim WT, Lee YH, Kang H, Lee I (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev Cell* 14:183–192
- Innes N (1983) Bacterial blight of cotton. *Biol Rev* 58:157–176
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Uedo J, Nishida I, Okada K (2001) The *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalysing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:2191–2200
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetsé K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylidès C, Daniel JF, Marmey P, Geiger J-P, Nicole M (2002) Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J* 32:1–12
- Knight VI, Wang H, Lincoln JE, Lulai EC, Gilchrist DG, Bostock RM (2001) Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiol Mol Plant Pathol* 59:277–286
- Kolomiets MV, Chen H, Gladon RJ, Braun EJ, Hannapel DJ (2000) A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol* 124:1121–1130
- La Camera S, Geoffroy P, Samaha H, Ndiaye A, Rahim G, Legrand M, Heitz T (2005) A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *Plant J* 44:810–825
- Lewis K (2000) Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol* 64:503–514
- Marmey P, Jalloul A, Alhamdia M, Assigbetsé K, Cacas JL, Voloudakis AE, Champion A, Clerivet A, Montillet JL, Nicole M (2007) The 9-lipoxygenase *GhLOX1* gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol Biochem* 45:596–606
- Matos AR, D’Arcy-Lameta A, Franca M, Petres S, Edelman L, Kader J-C, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT (2001) A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett* 491:188–192
- Matos AR, Gigon A, Laffray D, P tres S, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT (2008) Effects of progressive drought stress on the expression of patatin-like lipid acyl hydrolase genes in *Arabidopsis* leaves. *Physiol Plant* 134:110–120
- Melan MA, Dong X, Endara ME, Davis KR, Ausubel FM, Peterman TK (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* 101:441–450
- Montillet JL, Agnel JP, Ponchet M, Vaill au F, Roby D, Triantaphylidès C (2002) Lipoxygenase-mediated production of fatty

- acid hydroperoxides is a specific signature the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiol Biochem* 40:633–639
- Montillet JL, Cacas JL, Garnier L, Montané MH, Douki T, Bessoule JJ, Polkowska-Kowalczyk L, Maciejewska U, Agnel JP, Vial A, Triantaphylidès C (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. *Plant J* 40:439–451
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 59:501–520
- Nakai K, Kanehisa M (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14:897–911
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Fujita M, Ishida J, Nakashima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Kamiya A, Park P, Kobayashi M, Shinozaki K (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* phospholipase A *I*A gene in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol* 44:1246–1252
- Page RDM (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computer. *Comput Appl Biosci* 12:357–358
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé MT, Rosahl S, Castresana C, Hamberg M, Fournier J (2005) Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol* 139:1902–1913
- Rietz S, Holk A, Scherer GFE (2004) Expression of the patatin-related phospholipase A gene *AtPLA IIA* in *Arabidopsis thaliana* is up-regulated by salicylic acid, wounding, ethylene, and iron and phosphate deficiency. *Planta* 219:743–753
- Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylidès C (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein in tobacco leaves. *J Biol Chem* 274:36446–36455
- Rydel TJ, Williams JM, Krieger E, Moshiri F, Stallings WC, Brown SM, Pershing JC, Purcell JP, Alibhai MF (2003) The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 42:6696–6708
- Santos MA (1991) An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. *Nucleic Acids Res* 19:5442
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modelling server. *Nucleic Acids Res* 31:3381–3385
- Strickland J, Gregory LO, Walsh TA (1995) Inhibition of *Diabrotica* larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. *Plant Physiol* 109:667–674
- Véronesi C, Rickauer M, Fournier J, Pouéat ML, Esquerré-Tugayé MT (1996) Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica* pv *nicotianae* interaction. *Plant Physiol* 112:997–1004
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chételat A, Farmer EE (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J* 24:467–476

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Ismail EL HADRAMI, Professeur, Faculté des Sciences, Semlalia, Marrakech**

**Monsieur Patrick SAINDRAN, Chargé de Recherche, Institut de Biotechnologie des Plantes,  
Orsay**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame SAYEGH Majd**

NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 54501  
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"La résistance du cotonnier à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pv.  
*malvacearum*. Rôle du gène GhLOX1 dans la réaction hypersensible du cotonnier  
*Gossypium hirsutum* à *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Sciences Agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 02 novembre 2009

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



**La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestriis* pathovar *malvacearum***

**Rôle du gène *GhLOX1* dans la réaction hypersensible**

**Résumé** La RH est une réaction de défense. L'interaction entre *G.hirsutum* et *Xcm* repose sur le concept gène-à-gène. L'infection du cultivar Réba B50 possédant les gènes R *B2B3* par *Xcm18* conduit à une RH associée à une activité LOX, responsable de la peroxydation des lipides, et à la transcription du *GhLOX1*. Premièrement, 6 génotypes de *G.hirsutum* contenant divers gènes R ont été retenus pour analyser la variabilité de la réponse LOX suite à l'infection par *Xcm1*, 18 ou 20. Notre étude a porté sur plusieurs critères, le phénotype, la perte en eau, l'activité LOX et la transcription du *GhLOX1*. Les résultats montrent une variabilité du phénotype RH en fonction des sources de résistances. Pour chaque type d'interaction incompatible, l'activité LOX et la transcription du *GhLOX1* révèlent une augmentation significative corrélée à l'apparition des symptômes RH et à la diminution de la teneur en eau. La réponse LOX est conservée lors de la RH, quelle que soit la race de *Xcm* ou le génotype. Le *GhLOX1* considère comme un marqueur moléculaire de la résistance spécifique du cotonnier à *Xcm*. Deuxièmement, le rôle du *GhLOX1* dans la mise en place de la RH en analysant sa fonction potentielle par surexpression. Des cotylédons ont été transformés avec la séquence codante *GhLOX1* fusionnée au CaMV35S. Ces cotylédons transformés ont révélé (i) une activité LOX significativement supérieure à celle des cotylédons témoins montrant que le *GhLOX1* code pour une protéine active et (ii) un phénotype sans modifications apparentes par rapport à celui des cotylédons non transformées, sauf dans certains contextes d'interactions cotonnier/*Xcm* où la surexpression de ce gène induit l'apparition de symptômes de type RH. L'effet de l'agro-infiltration sur l'expression de certains gènes pendant la transformation a révélé l'induction précoce et non spécifique de l'expression de gènes de défense. Ces travaux constituent une première étape dans l'analyse fonctionnelle du *GhLOX1* dans la résistance spécifique du cotonnier à *Xcm*.

**Mots clefs** : lipoxygénase, *Xanthomonas*, *Gossypium hirsutum*, Bactériose, Résistance, Réponse hypersensible.

**Resistance of cotton plant *Gossypium hirsutum* to the Bacterial Blight caused by  
*Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*.  
Role of *GhLOX1* gene in the hypersensitive reaction**

**Abstract** The HR is a defense strategy. The interaction between *G.hirsutum* and *Xcm* is governed by the gene-for-gene concept. The infection of the cultivar Reba B50 that contains B2B3 R genes by race *Xcm18* leads to a HR associated with a LOX activity response involved in peroxidation of lipids and with transcription of *GhLOX1*. First, 6 genotypes of *G. hirsutum* containing various R genes were tested to analyze the variability of the LOX response following the infection by *Xcm1*, 18 or 20. Several criteria were investigated including the phenotype, the water loss, the LOX activity and *GhLOX1* transcription. The results showed variation in HR phenotype according to the tested R genes. For each type of the incompatible interaction, LOX activity and transcription of *GhLOX1* were always significantly increased paralleled the apparition of the HR symptoms and the decrease in the water content. LOX response (enzymatic activity and *GhLOX1* transcription) is associated with HR whatever the genotype of both *Xcm* races and cotton plant. Thus, the *GhLOX1* consider as a molecular marker of the cotton specific resistance to *Xcm*. Second, the role of the *GhLOX1* gene in the execution of the cotton HR to *Xcm* by analyzing its possible function by over-expression, the cotyledons were transformed with the *GhLOX1* coding sequence fused to the CaMV35S. These transformed cotyledons revealed (i) a LOX activity significantly higher than that detected in the control, showing that the *GhLOX1* encodes for an active protein and (ii) that the phenotype of these cotyledons was indistinguishable as compared to the non transformed cotyledons, except when the HR symptoms were induced in some *GhLOX1*-over-expressed cotyledons. The effect of agro-infiltration on expression of some plant genes during the transformation revealed early and nonspecific induction of the expression of defense genes. This work constitutes a preliminary investigation for the functional analysis of the *GhLOX1* in order to assess its role in the cotton specific resistance to *Xcm*.

**Keywords:** lipoxygenase, *Xanthomonas*, *Gossypium hirsutum*, Bacterial Blight, Resistance Hypersensitive.