

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : PHYSIOLOGIE

Formation doctorale : BASES DE LA PRODUCTION VEGETALE

Ecole Doctorale : BIOLOGIE DES SYSTEMES INTEGRES AGRONOMIE ENVIRONNEMENT

ROLES DES PEROXYDASES DANS LA RESISTANCE
DU COTONNIER A LA BACTERIOSE CAUSEE
PAR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PATHOVAR
MALVACEARUM

par

MARTINEZ Christelle

Soutenue le 15 décembre 1997, devant le jury composé de

M. J. D'Auzac	Professeur, Université Montpellier II	Examineur
M. J.P. Blein	Directeur de Recherche, INRA Dijon	Rapporteur
M. J.P. Geiger	Directeur de Recherche, ORSTOM	Directeur de Thèse
M. J. Mansfield	Professeur, Université de Londres	Rapporteur
M. J.L. Montillet	Chargé de Recherche, CEA Cadarache	Examineur
M. M. Nicole	Directeur de Recherche, ORSTOM	Examineur

à mes parents

à mes grand-parents

à Jean-Claude

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à:

M. GEIGER J.P., Directeur du laboratoire de Phytopathologie Tropicale de l'ORSTOM, pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse. Je le remercie de m'avoir appris les techniques de purification des protéines et de m'avoir soutenue au cours de l'élucidation des mystères peroxydasiques.

M. NICOLE M., pour ses conseils, l'efficacité de son aide et sa grande disponibilité. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa patience et la bonne humeur qu'il a su entretenir durant ces trois années.

Mlle BRESSON E., pour son aide précieuse durant mes années de thèse. Pour les bons moments que l'on a passé ensemble, je tiens à lui exprimer toute mon amitié.

M. MONTILLET J.L., pour sa précieuse collaboration dans l'étude du stress oxydatif, et tout le temps qu'il m'a consacré.

MM. MANSFIELD J. et BLEIN J.P., pour avoir accepté de juger ce travail et pour les discussions intéressantes sur la réaction hypersensible des végétaux.

M. D'AUZAC J., pour avoir examiné ce travail, et pour m'avoir fait bénéficier de ses remarques judicieuses concernant l'enzymologie.

M. DANIEL J.F., pour les renseignements concernant les aspects génétiques de la relation coton-*Xanthomonas campestris*.

Mlle FERNANDEZ D. et M. ASSIGBETSE K. pour m'avoir initiée aux techniques de biologie moléculaire.

MM. BACOU J.C. et BESSAC Y., pour m'avoir accueillie au laboratoire de Physiologie et Technologie des Végétaux, où j'ai effectué les dosages d'acide salicylique.

M. DURNER J., chercheur au laboratoire de Biologie Moléculaire et de Biochimie à l'Université d'Etat de Piscataway (New Jersey, USA) pour avoir répondu à toutes mes questions sur l'acide salicylique.

Chaleureux remerciements à toutes les personnes du laboratoire de Phytopathologie de l'ORSTOM pour leur amitié et leurs encouragements: B. Boher, N. Kovalsky, K. Kpémoua, F. Lopez, B. Nusslein, M. Quinten, C. Puech, S. Roussel, C. Valette.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	5
I- Le cotonnier	6
A. Taxonomie et Morphologie	6
B. Importance économique du cotonnier	7
C. Les maladies du cotonnier	8
II- La bactériose du cotonnier : Interactions entre le cotonnier et <i>Xcm</i>	9
A- Historique et répartition de la maladie	9
B - L'agent de la bactériose du cotonnier : <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>malvacearum</i>	9
1 -Taxonomie, morphologie et physiologie	9
2- Le cycle de la bactérie	11
3 -Les symptômes aux champs causés par <i>Xcm</i>	11
4 - L'incidence de la bactériose sur la culture cotonnière	12
III- Les moyens de lutte connus contre la bactériose	13
A - Les traitements chimiques des graines et des feuilles	13
B - Les techniques culturales.	14
C - Le contrôle biologique	14
D - Mise au point de variétés résistantes	14
IV- Nature de la résistance du cotonnier à <i>Xcm</i>	15
V - Objectifs de la thèse	16
CHAPITRE 1 : Identification des peroxydases en fonction de l'infection dans des systèmes incompatible et compatible. Purification et propriétés physico-chimiques	18
Introduction	19
Matériels et Méthodes	22
I- Le matériel végétal	22
II- L'agent pathogène	22
1 - Origine	22
2 - Conditions de culture	22
3 - Protocole de l'infection artificielle	23
4 - Evaluation du nombre de bactéries dans les cotylédons infectés	23
III- Détection des activités peroxydasiques	23
1 - Empreinte de tissus foliaires sur membrane de nitrocellulose.	23
2 - Extraction des peroxydases	24
3 - Dosage des protéines totales	24
4 - Tests enzymatiques	24
IV- Purification des peroxydases anioniques, et caractéristiques physico-chimiques	24
1 - Purification	24

2 - Contrôle de la pureté des peroxydases	26
V- Détermination du pH isoélectrique des peroxydases par IEF	27
VI- Localisation histochimique de l'activité peroxydasique	28
VII- Localisation ultrastructurale de l'activité peroxydasique	28
VIII- Analyse moléculaire	28
1. Matériel bactérien et végétal : cinétique d'infestation	28
2. Extraction des ARN cellulaires totaux	29
3. Dosage et vérification de l'intégrité des ARN	29
4. Préparation de "dot-blots"	30
5. Hybridation de la sonde cDNA "peroxydase"	30
Résultats	32
I - Description comparée des symptômes	32
II - Evaluation du nombre de bactéries dans les cotylédons infectés	32
III - Evolution quantitative des protéines totales dans les tissus foliaires durant l'infection	32
IV - Détection et localisation de l'activité peroxydasique par empreintes de tissus foliaires sur membrane de nitrocellulose	33
V - Evolution de l'activité peroxydasique	34
1 - Variations de l'activité peroxydasique dans les cotylédons infectés	34
2 - Variations de l'activité peroxydasique dans les feuilles non inoculées	35
VI - Mise en évidence d'isoperoxydases chez le cotonnier	36
1 - Les peroxydases anioniques des cotylédons	36
2 - Les peroxydases anioniques dans les feuilles non traitées	36
3 - Les peroxydases cationiques	36
VII- Purification des peroxydases anioniques; contrôle de pureté des peroxydases	37
1 - Essai de séparation des isoenzymes anioniques	37
2 - Caractéristiques spectrales des peroxydases	39
3 - Détermination des Poids Moléculaires	40
VIII- Détermination du pH optimal d'activité des peroxydases anioniques	40
IX- Déglycosylation des peroxydases anioniques	41
X- La localisation histochimique de l'activité peroxydasique	42
XI- Localisation cytochimique de l'activité peroxydasique	42
XII- Expression des ARN messagers de peroxydase au cours de l'infestation du cotonnier par <i>Xcm</i>	42
Discussion	44
I- Les peroxydases anioniques	45
II- Détermination des poids moléculaires des peroxydases anioniques	48
III- Les peroxydases cationiques	49
IV- Synthèse de novo?	49

CHAPITRE 2 : Rôle des peroxydases dans la réaction hypersensible. Mise en évidence de leur implication dans la génération de formes réactives de l'oxygène.	52
Introduction	53
Results	58
I- <i>In vivo</i> characterization of the oxidative burst in cotton varieties Reba B50 and Acala 44.	58
II- Time course changes in AOS production and NADH oxidation activity during cotton/ <i>Xcm</i> interactions.	59
III- Characterization of the NADH oxidation activity.	60
IV- Cytochemical characterization of peroxidase activity	62
V- Induction of HR-like symptoms	63
Discussion	64
Experimental procedures	71
I- Biological materials, inoculation, and treatment of plants	71
II- Assay of extracellular cytochrome c reducing activity of cotyledon discs	71
III- Preparation of crude extracts and apoplastic washing fluids (AWF) from cotton cotyledons	72
IV- Assay of NADH oxidase	73
V- Isoelectric focusing method (IEF)	73
VI- Ultrastructural localization of peroxidase activity	74
VII- Histochemical localization of hydrogen peroxide	74
CHAPITRE 3 : Place des peroxydases dans la réponse systémique acquise. Le rôle de l'acide salicylique dans le déclenchement de l'activité peroxydase.	76
Introduction	77
Matériels et Méthodes	80
I- Numération bactérienne dans les feuilles inoculées.	80
II- Dosage de l'acide salicylique (AS) endogène libre .	80
III- Détermination du temps de déclenchement de la SAR.	81
IV- Effet de l'infiltration de H ₂ O ₂ exogène.	81
V- Effet de l'AS exogène.	82
VI- observations histochimique et cytologique	82
1-Histochimie des composés phénoliques	82
2-Histochimie des composés terpéniques	82
3-Immunolocalisation de la callose	83
Résultats	84
I- Comptage de bactéries dans les feuilles inoculées par <i>Xcm</i> .	84
II- Cinétique d'apparition de l'acide salicylique (AS)	84
III- Détermination du temps de déclenchement de la SAR.	85

IV- Effet de H ₂ O ₂ sur la concentration en acide salicylique (AS) et l'activité peroxydasique	86
V- Effet de l'AS exogène sur l'activité des peroxydases	86
VI- Analyse microscopique	87
1- Histochimie des composés phénoliques	87
2- Histochimie des composés terpéniques	87
3- Immunolocalisation de la callose	87
Discussion	88
I- Induction de gènes de défense.	88
II- L'activité peroxydase : un marqueur de la résistance systémique (SAR) chez le cotonnier ?	89
III- Le rôle de l'Acide Salicylique (AS) dans la résistance systémique (SAR).	90
IV- Acide Salicylique et burst oxydatif dans la réaction hypersensible.	92
V- Reflexions sur le système gène - pour - gène dans l'interaction cotonnier / <i>Xanthomonas</i> .	95
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	97
BIBLIOGRAPHIE	103
ANNEXES	123

INTRODUCTION GENERALE

I- Le cotonnier

A- Taxonomie et Morphologie

Le cotonnier est une plante dicotylédone dialypétale de l'ordre des Malvales, de la famille des Malvacées et de la tribu des Hisbiscées. Le genre *Gossypium* L. 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 morphologie du cotonnier varie considérablement suivant l'espèce, le milieu et les conditions de culture. Une espèce sauvage se présente sous la forme d'un arbuste pouvant atteindre plusieurs mètres de hauteur; en revanche, le développement des variétés cultivées est plus limité, la taille moyenne variant entre 1 et 1,5 mètre. A l'âge adulte, la tige du cotonnier forme des noeuds régulièrement espacés au niveau desquels émergent des rameaux de natures distinctes:

- les branches végétatives à croissance de type indéfini, monopodiale. Elles sont situées sur les premiers noeuds de la tige principale et ne portent pas de fleurs;
- les branches fructifères qui produisent une fleur à chaque noeud. Elles ont un mode de croissance sympodial de type défini. Elles se développent à partir de tous les noeuds du tronc principal situés au-dessus d'un certain niveau. Le développement de chacune d'elles est stoppé par la formation d'un bouton floral et la croissance ultérieure reprend à partir du premier bourgeon axillaire accompagnant la fleur.

Le système racinaire forme un cône dense dont le développement est important et rapide. De la racine principale émergent des racines latérales dont l'apex est recouvert d'une zone pilifère.

L'appareil foliaire se caractérise par un important polymorphisme. Les lobes des feuilles peuvent être arrondis (cotylédons), lamelliformes ou découpés. La surface foliaire est soit lisse, soit velue.

La fleur se compose des éléments suivants:

- un calicule formé de 3 bractées,
- un calice gamosépale à 5 sépales généralement soudés,
- une corolle dialypétale à 5 pétales dont la couleur varie selon les espèces,

- l'androcée, dont une partie soudée forme la colonne staminale qui entoure l'ovaire et se soude aux pétales,
- le gynécée, formé d'un ovaire surmonté d'une colonne stylaire se terminant par un stigmate et constitué d'autant d'éléments que de loges soudées pour former l'ovaire.

Le cotonnier est généralement considéré comme une plante autogame, avec possibilité de fécondation croisée. Après la floraison, le fruit du cotonnier se développe sous la forme d'une capsule ovoïde contenant environ trente graines. A maturité, après lignification des tissus, la capsule s'ouvre et laisse apparaître les fibres de coton associées aux graines.

B- Importance économique du cotonnier

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. Les cotonniers produisent la fibre textile naturelle la plus exploitée dans le monde. Plus de 70 pays, les Etats-Unis en tête, exploitent actuellement le cotonnier dont la production mondiale annuelle en fibre est évaluée à 20,7 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. Cette production est évaluée à plus de 6 milliards de francs français dont la moitié revient immédiatement ou à court terme, aux 1,2 million d'exploitants agricoles concernés. L'Afrique francophone est ainsi le troisième exportateur mondial de fibres derrière les Etats-Unis et l'Ouzbékistan (Texier, 1996)

Actuellement, l'exploitation du cotonnier ne se limite plus à la seule production de fibre, puisque la graine est devenue 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 sahéliens, ainsi qu'au Cameroun et en Côte d'Ivoire. 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).

C- Les maladies du cotonnier

Comme de nombreuses monocultures, tant à l'échelle industrielle que villageoise, les champs de cotonnier subissent une forte pression parasitaire aux conséquences très sévères sur la production. En effet, 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 (pucerons, aleurodes, punaises...) auxquelles s'ajoutent les acariens, les diplopodes 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 (virose, maladie à mycoplasmes). L'étiologie des maladies est variée; en effet on recense des champignons, des bactéries, des mycoplasmes et des virus. Les agents pathogènes les plus fréquemment recensés sont *Colletotrichum gossypium* (Soughe), *Pythium aphanidermatum* (Edse) Fitz, *P. celtimum* (Trow), *Rhizoctonia solani* Kün, *Macrophomina phaseoli* (Fassi), *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Link, *Verticillium dahliae*, et *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*. (*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, incluant la Chine, l'ex-URSS et les Etats-Unis. En Afrique, elle est souvent la maladie la plus importante.

II - La bactériose du cotonnier : Interaction entre le cotonnier et *Xcm*

A- 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 fruit

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 (1930) sur des cultivars de *G. barbadense*. D'autres études épidémiologiques furent menées simultanément au Soudan par Findlay (1928) et Stoughton (1930, 1931, 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 lutter contre la bactériose, 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)

B- L'agent de la bactériose du cotonnier: *Xanthomonas campestris pathovar malvacearum*

1- Taxonomie, morphologie et physiologie

La bactérie responsable de la bactériose du cotonnier fût appelée à

l'origine *Pseudomonas malvacearum* par Smith (1901), puis plus tard *Bacterium malvacearum* (E.F.Smith) Dow, et enfin *Xanthomonas 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'hôte (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 stricte. Sur milieu nutritif *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) associés à un polysaccharide extracellulaire appelé xanthane.

La variabilité du pouvoir pathogène de la bactérie est importante et a fait l'objet de nombreuses études. 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 l'existence d'une spécificité de races chez *Xcm* et 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) 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 intergéniques ou des délétions au niveau des gènes d'avirulence 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).

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** où 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 (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'infection 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 dans les débris des cultures, assurant ainsi sa survie dans le sol lorsque les feuilles de cotonnier infectées tombent et que les graines contaminées sont utilisées.

3 -Les symptômes aux champs causés par *Xcm*

Le cotonnier peut être contaminé par la bactérie dès le jeune plant, et à tous les stades de son développement. La maladie s'étend alors des cotylédons jusqu'aux feuilles, puis à la tige et aux graines en formation. Les symptômes varient selon les organes affectés.

Sur les cultivars sensibles, les premiers signes de la maladie peuvent d'abord être observés sur le cotylédon. De petites tâches 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 tâches 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 aussi 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.

4 - 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% au champ, qui peut atteindre 77% lorsque l'infection est sévère. 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, 1971a, b). 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 de l'introduction d'une nouvelle race.

III - Les moyens de lutte connus contre la bactériose

A - Les traitements chimiques des graines et des feuilles

En culture cotonnière, peu de maladie peuvent être 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 contamination. 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; Brown, 1976). 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 (Jalali et Grover, 1974; 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 tétracycline (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 (Jalali et Grover, 1974) donnent les meilleurs résultats. Verma (1986) conclut dans sa revue sur le contrôle chimique de la bactériose que la technique la plus sûre est la désinfection chimique des graines, suivie 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.

B- Les techniques culturales.

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.

C- Le contrôle biologique

Verma et Singh (197a, 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).

D - Mise au point de variétés résistantes

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 au champ, 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 par hybridation 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 dont les associations de gènes majeurs réactualisent le problème de la bactériose (Hillocks, 1992), et redynamise la recherche de nouveaux facteurs de résistance. La remise en question de la lutte génétique par l'apparition récurrente des nouvelles races de *Xcm*, montre qu'il n'existe pas actuellement de méthodes de protection permettant l'éradication de *Xcm* des champs de cotonniers.

IV- Nature de la résistance du cotonnier à *Xanthomonas*

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-B1, B2, B3...) 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). Dans le cas de la bactériose du cotonnier, où 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*. 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 B2B3 et B9LB10L découvertes chez *G. hirsutum*. 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 B7 influence négativement l'association des gènes B2-B3 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 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 réaction hypersensible (RH). La RH se caractérise par la formation rapide de lésions nécrotiques sur le site

même de la pénétration de la bactérie. Grâce à cette réaction, la bactérie ne peut plus progresser à l'intérieur de la plante. La RH est généralement accompagnée par une multitude de réactions de défense.

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 relation a été mise en évidence entre la résistance du cotonnier à *Xcm* et le taux d'aldéhydes synthétisés (Hillocks, 1992).

Essenberg et Pierce (1994), ont identifié deux phytoalexines (2-4-dihydroxycadalène et laciniline) à partir de feuilles et de cotylédons de plants résistants attaqués par la bactériose, synthétisées à un niveau suffisant pour inhiber l'agent pathogène au site d'infection. Trois nouveaux sesquiterpènes, les isomères *cis* et *trans* du 7-hydroxycalaménène-2-one, ainsi que le *trans*-7-hydroxycalaménène ont été identifiés dans des extraits de cotylédon de cotonnier résistant durant la période de biosynthèse de phytoalexines sesquiterpénoïdes, après inoculation par *Xcm* (Davila-Huerta et al., 1994). La synthèse *de novo* de flavonoïdes a également été mise en évidence autour des sites d'infection pendant la réaction incompatible (Daï et al., 1996).

V- Objectifs de la thèse

Bien que diverses réactions de défense du cotonnier soient étudiées concernant l'interaction entre le cotonnier et *Xcm*, peu de travaux ont été effectués sur le rôle des peroxydases dans la résistance. D'une manière générale, les peroxydases sont connues pour être impliquées dans la résistance des plantes aux agents pathogènes. On leur reconnaît un rôle dans la synthèse de la lignine (Ride, 1983), ainsi que de la subérine (Mohan et Kolattukudy, 1990), dans les parois cellulaires de la plante pour former une barrière physique à la pénétration de l'agent pathogène. Des composés phénoliques peuvent être convertis en composés antimicrobiens par les peroxydases (Beckman, 1987; Kobayashi et al., 1994). Quelques auteurs rapportent l'implication de peroxydases dans la production d'oxygène actif lors de réactions incompatibles caractérisées par une RH (Sutherland, 1991; Tenhaken et al., 1995; Baker et Orlandy, 1995), mais sans en avoir démontré expérimentalement leur implication effective.

En ce qui concerne le cotonnier, seul Venere (1980) a démontré l'accroissement de l'activité peroxydasique dans les cotylédons de cotonniers résistants inoculés par une suspension de *Xcm*. Il note alors que l'augmentation d'activité peroxydasique chez la variété résistante est associée à une chute de la population bactérienne, et suggère que l'oxydation de la catéchine (phénol majoritaire chez les cotonniers) par les peroxydases pourrait être à l'origine de la résistance contre *Xcm*.

En raison de l'importance des peroxydases dans la résistance et la défense des plantes aux agressions biotiques et abiotiques, et, compte-tenu de l'ignorance quant à leur rôle dans l'interaction cotonnier/*Xcm*, je me suis proposée d'analyser et d'étudier le(s) rôle(s) des peroxydases dans les différentes étapes de la résistance du cotonnier à *Xcm*. Le mémoire est organisé en trois chapitres :

- le premier traite de la caractérisation des différentes peroxydases impliquées dans les étapes de la résistance du cotonnier à *Xcm*

- le second s'intéresse au rôle des peroxydases cationiques dans l'initiation de la RH.

- le troisième a pour objectif d'établir une relation entre les peroxydases et les événements intervenant plus tardivement dans les mécanismes de résistance chez le cotonnier en réponse à *Xcm*.

CHAPITRE 1

Identification des peroxydases en fonction de
l'infection dans des systèmes
incompatibles et compatibles.

Purification et propriétés physico-chimiques

RESUME

L'activité peroxydasique et le profil électrophorétique des isoenzymes ont été étudiés sur des extraits de cotylédons et de feuilles de cotonnier, inoculés par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*). L'activité totale augmente significativement dans les cotylédons de la variété résistante Réba B50 à partir de dix heures après l'inoculation par *Xcm* race 18. Parmi les deux interactions compatibles testées (Réba B50/race 20 et Acala 44/race 18), seule la variété Réba B50 manifeste une augmentation d'activité significative dans les cotylédons inoculés par *Xcm* race 20, mais à un niveau inférieur à celui de l'interaction incompatible. En parallèle, on observe une augmentation systémique d'activité peroxydasique dans les feuilles de cette variété, inoculée par *Xcm* race 18 ou 20. Le taux d'inhibition bactérienne est corrélé au niveau d'activité peroxydasique observé dans les cotylédons inoculés.

Sept isoformes ont été détectées dans les cotylédons sains ou inoculés des deux variétés (cinq isoformes anioniques, et deux isoformes cationiques (P1 à P7)). Dans le cas de l'interaction incompatible, la forte augmentation d'activité affecte essentiellement les deux isoenzymes P1 et P2 de point isoélectrique 3,6 et 4,2. Dans le cas de l'interaction compatible ou de l'activation systémique d'activité, les cinq isoformes anioniques sont stimulées. Une augmentation d'activité de l'isoforme P7 (point isoélectrique 9,45) très localisée dans le temps a été mise en évidence trois heures après l'inoculation de la variété Réba B50 par *Xcm* race 18. Lors d'une cinétique d'expression des ARNm de peroxydase, les résultats semblent indiquer que la quantité d'ARNm est supérieure aux temps 3h, 12h, et 24h. Les trois étapes successives de purification (précipitation à l'acétone, colonne Q, colonne à interaction hydrophobe) ont permis d'obtenir l'ensemble des cinq isoperoxydases anioniques avec un très bon taux de purification (A405/A280=3), mais aucune méthode ne nous a permis de séparer les isoenzymes entre elles. La purification nous a permis cependant de déterminer deux PM de 60kDa et 45kDa, sans attribution d'une isoforme à un PM.

La technique d'empreinte de tissus foliaires sur membrane de nitrocellulose démontre que la forte activité peroxydasique lors de l'interaction incompatible a lieu dans la zone d'infiltration qui évoluera en réaction hypersensible. L'observation microscopique a révélé la présence d'une activité peroxydasique localisée dans les parois des cellules infiltrées trois heures après inoculation dans le cas de l'interaction incompatible. La localisation histochimique a permis de détecter une augmentation d'activité cytoplasmique à partir de quatre heures après l'inoculation, toujours dans le cas de l'incompatibilité.

INTRODUCTION

Les plantes subissent en permanence ce qu'il est convenu d'appeler une "pression parasitaire" de la part de nombreux microorganismes pathogènes, mais dans les faits le taux de maladie reste relativement faible, en raison:

- (1) de l'incapacité de la plante à répondre aux besoins trophiques et de multiplication du microorganisme;
- (2) de la présence, dans la plante, de barrières constitutives ou de composés antimicrobiens qui empêchent la propagation de l'agent infectieux, ou
- (3) d'une incompatibilité entre les deux protagonistes.

Dans ce dernier cas, il existe une véritable relation interactive génétiquement programmée entre la plante et le parasite. Brièvement, l'incompatibilité résulte de la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante. Cette reconnaissance est fondée sur l'interaction entre le produit d'un gène de résistance de la plante et le produit d'un gène d'avirulence (*avr*) du parasite, d'où la désignation de relation "gènes pour gènes" (ou gènes à gènes) communément utilisée dans ce type d'interaction. En cas de reconnaissance (couple incompatible), des mécanismes spécifiques sont développés par la plante, lui conférant le caractère de résistance tandis que l'invasion des tissus hôtes par le microbe demeure très localisée. Dans ce cas, la plante répond généralement par une réaction d'hypersensibilité (RH) associée à la mise en oeuvre de mécanismes de défense tels que la synthèse de phytoalexines ou de PR protéines, et/ou de molécules impliquées dans le renforcement de la paroi cellulaire.

Suite à une infection conduisant à une réaction d'hypersensibilité, les végétaux peuvent développer une résistance accrue face à de nouvelles attaques de microorganismes, notamment dans les parties non infectées de la plante. Ce mécanisme est appelé résistance systémique acquise (SAR: Systemic acquired resistance). L'absence de reconnaissance, pour quelque raison que ce soit (absence ou modification de gène de résistance ou d'avirulence...) conduit à la compatibilité, donc à la possibilité de l'agression parasitaire et à son corollaire, le développement de la maladie, même si des gènes de défense sont activés (qui auront pour effet potentiel de limiter les dégats).

Les molécules impliquées dans les réactions de défense sont de nature

multiple, incluant des protéines de structure (HRGP), des composés phénoliques, des enzymes... Parmi les enzymes impliquées dans la résistance des plantes, les peroxydases (EC 1.11.1.7. H₂O₂ oxidoreductase) sont connues pour jouer plusieurs rôles contre l'invasion des organismes étrangers dans de nombreuses espèces végétales comme l'orge (Kerby et Somerville, 1992; Craig et al., 1995), le tabac (Montalbini et al., 1995; Buonauro and Montalbini, 1995), le blé (Holden et Rorhinger, 1985), le riz (Young et al., 1995), ou encore la tomate (Reuveni et Ferrera, 1985). Elles interviennent notamment dans la modification de la paroi cellulaire résultant d'une augmentation de la synthèse de lignine (Polle et al., 1994) et/ou de subérine (Espelie et al., 1986), de pontages covalents entre les protéines de la paroi cellulaire, de l'incorporation de flavonoïdes dans les parois (Kobayashi et al., 1994). Ces enzymes, intervenant dans les différents mécanismes qui conduisent à une rigidification de la paroi, permettent ainsi à la cellule de se protéger de toute pénétration par un agent pathogène, pour autant qu'il soit incapable de dégrader ces barrières nouvellement édifiées. Les peroxydases se voient attribuer une place prépondérante dans la détoxification d'un excès d'espèces actives de l'oxygène produites notamment en réponse à un agent pathogène dans le cas de la résistance. Quelques auteurs suggèrent également que les peroxydases participeraient à la formation d'espèces actives de l'oxygène à la fois toxiques pour les agents pathogènes et impliqués dans la formation de la RH (Sutherland, 1991; Kiba et al., 1997).

Dans les plantes, les peroxydases sont très répandues. Outre leur rôle dans les mécanismes de résistance, elles sont généralement connues pour être impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels la régulation de l'élongation cellulaire (Goldberg et al., 1986), l'oxydation des phénols (Schmid et Feucht, 1980), la polymérisation de polysaccharides (Fry, 1986), l'oxydation de l'auxine (Beffa et al., 1990), ou encore la polymérisation de monomères d'extensine (Everdeen et al., 1988). Les nombreuses isoenzymes de peroxydases des plantes peuvent différer par leurs propriétés physico-chimiques, leur structure et leur fonction. Ces enzymes sont capables d'utiliser le peroxyde d'hydrogène pour oxyder une grande variété de donneurs d'hydrogène, comme les substances phénoliques, les nitrites, l'acide ascorbique, les amines. Elles ne sont pas spécifiques du donneur d'hydrogène mais leur activité est dépendante du peroxyde d'hydrogène. Le nombre et la concentration des isoperoxydases varient en fonction du type tissulaire, de l'âge de la plante, des conditions de stress abiotiques et biotiques et,

dans ce dernier cas, de l'agent pathogène impliqué dans l'interaction avec l'hôte.

Chez le cotonnier, la distribution des peroxydases dans différents organes de la plante a été étudiée en réponse à l'infection par divers champignons; leur expression ne semble pas être toujours liée à la résistance de la plante (Veech, 1976; Sharma et al., 1984; Mellon et Lee, 1985). Après inoculation avec des bactéries, seul Venere (1980) rapporte une augmentation d'activité peroxydasique dans les cotylédons en réponse à l'inoculation avec *Xcm*, associée à une diminution de la population bactérienne chez les cotonniers résistants à la bactériose.

Dans notre étude, notre premier objectif a été de disposer au plan expérimental de deux couples cotonnier-*Xcm* développant l'un une relation compatible, l'autre une relation incompatible. En général on peut faire appel à des interactions entre une variété de plante et une souche virulente et une souche avirulente du même agent pathogène. Un autre modèle d'étude consiste en l'utilisation de deux lignées végétales dont l'une est sensible, l'autre résistante à une même race du parasite. Afin de répondre aux deux conditions, deux variétés de cotonnier et deux races de *Xcm* ont été utilisées :

- la variété Réba B50, résistante à l'égard de *Xcm* race 18 réagit par une RH visible dès dix heures après l'inoculation; elle est en revanche sensible à la race 20 et forme donc, avec cette race, un couple compatible (pas de RH).

-la variété Acala 44 ne contient aucun gène de résistance, et, par conséquent, forme un couple compatible avec l'une et l'autre race de *Xcm*.

Variétés de <i>Gossypium hirsutum</i>	Race de <i>Xanthomonas</i>	
	18	20
Réba B50	R	S
Acala 44	S	S

Au cours des travaux exposés dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à caractériser, sur la base de différentes méthodes (IEF, SDS-PAGE, dosage d'activité au spectrophotomètre, empreinte de tissus foliaires, chromatographies, histologie...), les isoperoxydases dans les cotylédons et feuilles de cotonnier et d'analyser l'évolution de leur activité dans les deux types d'interactions.

MATERIEL ET METHODES

I - Le matériel végétal

Les plants de cotonnier sont cultivés sous lumière naturelle dans une serre tropicalisée, dont la température est maintenue à 30°C +/- 2°C et l'humidité relative à 80%.

Deux variétés de cotonnier sont utilisées:

- *G. hirsutum* cultivar (cv) Acala 44: cette variété sensible à toutes les races de *Xcm*, ne possède pas de gènes de résistance.

- *G. hirsutum* cv Réba B50: cette variété est résistante à toutes les races de *Xcm* à l'exception de la race 20. Cette variété possède deux gènes de résistance B2-B3.

II - L'agent pathogène

1 - Origine

L'étude des interactions entre les variétés de cotonnier et *Xcm* a été réalisée avec deux souches bactériennes, les races 18 et 20, provenant du Burkina Faso, isolées à partir de feuilles de *G. hirsutum* var. ISA 205. La race 18 est virulente à l'égard de tous les cultivars ne possédant pas les 2 gènes de résistance B2-B3. La race 20 a surmonté cette résistance; elle est de ce fait virulente à l'égard de Réba B50.

2 - Conditions de culture

Les souches de *Xcm* sont cultivées sur milieu LPGA (5g d'extrait de levure, 5g de bacto-peptone, 5g de glucose, 15g d'agar, H₂O q.s.p. 1L). Sur ce milieu, les colonies sont de couleur jaune et présentent un aspect lisse et muqueux. La souche est conservée à 5°C afin de réduire les risques d'une perte de virulence. Les inocula utilisés au cours de cette étude ont été préparés en transférant, après contrôle de la pureté de la souche, une colonie dans 100mL de milieu liquide LPG

(5g d'extrait de levure, 5g de bacto-peptone, 5g de glucose q.s.p.1L). Les cultures sont incubées sous agitation à 30°C pendant 12h. La suspension bactérienne est ensuite centrifugée à 6000g pendant 10min. Les culots obtenus sont soumis à deux lavages avec de l'eau stérile. La suspension bactérienne finale est ajustée au spectrophotomètre à une DO₆₀₀ de 0,1 correspondant à 10⁸ ufc/mL (ufc: Unité formant colonies).

3 - *Protocole de l'infection artificielle*

Les inoculations sont réalisées à la face inférieure des cotylédons de jeunes plants âgés de 10 jours, par infiltration de la suspension bactérienne à l'aide d'une seringue dépourvue d'aiguille. Pour chaque variété, deux lots de jeunes plants témoins sont réalisés: le premier consiste en un lot de plantules infiltrées avec de l'eau stérile, le second n'est soumis à aucune infiltration.

4 - *Evaluation du nombre de bactéries dans les cotylédons infectés*

Des cotylédons infectés, de surface et de poids déterminés, sont broyés dans de l'eau stérile à raison de 2mL pour 1g de matière fraîche (MF). Après différentes dilutions en cascade du broyat dans de l'eau stérile (dilution 1/10, 1/100...1/100000), 25 ou 50µL de chaque dilution sont déposés sur boîte contenant du milieu LPGA. Les boîtesensemencées sont alors incubées à 30°C pendant 48h. Le comptage des bactéries est exprimé en ufc/cm².

III - **Détection des activités peroxydasiques**

1 - *Empreinte de tissus foliaires sur membrane de nitrocellulose.*

Un cotylédon infecté ou sain est trempé durant 30s dans l'éthanol à 70%. L'épiderme inférieur est alors abrasé par application douce de carborundum. Le cotylédon est ensuite séché sur papier absorbant, puis déposé face inférieure contre la membrane de nitrocellulose (porosité 0,2 µm). L'ensemble (cotylédon + membrane) est pris en sandwich entre deux feuilles de papier Wathman N°1 et deux plaques d'aluminium. Une pression de 20kg/cm² est exercée pendant 1min sur ces plaques à l'aide d'une presse hydraulique. La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée 2min dans une solution contenant le substrat des peroxydases (voir III - 4). Les zones contenant une activité peroxydasique se colorent en violet.

2 - Extraction des peroxydases

Les cotylédons sont broyés dans du tampon acétate de sodium 0,05M pH 5, à 25mM en β -mercapto-éthanol, à raison de 2mL de tampon pour 1g de MF. Du polyclar AT (5% p/p MF) est immédiatement ajouté au broyat et la suspension est agitée pendant 10min. Cet extrait brut est alors centrifugé à 12000g pendant 15min et le surnageant contenant les peroxydases est filtré sur membrane de polysulfone (GELMAN Sciences, porosité 0,45 μ m).

Pour des volumes de l'ordre de 100mL, l'extrait est filtré sur toile à blutter avant centrifugation (Extrait E1).

3 - Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué sur le surnageant selon la méthode de Bradford (1976). Une gamme étalon est effectuée avec plusieurs concentrations d'albumine de sérum de bovin (BSA).

4 - Tests enzymatiques

L'activité peroxydasique est mesurée à 470nm au spectrophotomètre en milieu tamponné (citrate-phosphate: 0,05M à pH6; volume final:1mL) contenant du guaiacol à 0,2% et de l'eau oxygénée à 0,1%. Le temps de mesure est généralement égal à une minute, et le déroulement de la réaction est enregistré en continu, à température ambiante. L'activité, calculée à partir de la portion linéaire du graphe, est exprimée en nKat/mg de protéine, en considérant le tétraguaiacol comme seul produit de réaction. Le coefficient d'extinction molaire est de $26,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

IV - Purification des peroxydases anioniques et caractéristiques physicochimiques

1 - Purification

La purification des peroxydases est effectuée à partir de cotylédons de plantules de la variété Réba B50 âgées de 10 jours. Les cotylédons sont récoltés 72h après inoculation par *Xcm* race 18. L'extrait brut (E1) est obtenu selon le protocole indiqué ci-dessus. Les chromatographies sur colonne sont réalisées à l'aide d'un appareil FPLC (WATERS).

a - Précipitation à l'acétone

La précipitation acétonique fractionnée (entre 30 et 60% d'acétone) a été préférée à l'habituelle précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium moins

performante dans notre cas particulier. A cet effet, à l'extrait E1 on ajoute, sous agitation, un volume adéquat d'acétone froid (4°C) de manière à amener l'extrait à 30% en acétone. Après 30min, le flocculat est ensuite éliminé par centrifugation (5000g, 5min) et le surnageant est amené à 60% d'acétone. Le nouveau flocculat est récupéré par centrifugation, le culot est lavé par de l'acétone pure, puis séché sous jet d'azote et enfin repris dans 10mL de tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5 (extrait E2). Cette étape permet de récupérer au minimum 60% de l'activité peroxydasique initiale, de réduire le volume d'extrait et d'augmenter nettement l'activité spécifique.

b - Chromatographie sur colonne Q

Cette chromatographie est réalisée sur une colonne échangeuse d'anions Q-15HR, 10x100mm (WATERS) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5. L'extrait E2 est déposé sur la colonne à un débit de 1,5mL. min⁻¹. Après rinçage des protéines non retenues, l'élution est réalisée dans les mêmes conditions par un gradient de 0 à 0,35M en NaCl en 100min dans le tampon d'équilibrage. Des fractions de 1,5mL sont collectées. Les peroxydases sont éluées à 0,1M de NaCl et les fractions contenant l'activité peroxydase sont regroupées (E3). L'élution est enregistrée en continu à deux longueurs d'onde, permettant de repérer respectivement les protéines en général (280nm) et les peroxydases en particulier grâce à leur groupement prosthétique, l'hème, qui absorbe à 405nm.

c - Chromatographie d'interactions hydrophobes

Elle est réalisée sur une colonne hydrophobe (Phényl superose, HR 5/5, Pharmacia) équilibrée dans du tampon phosphate de potassium 50mM (pH 7), en présence de sulfate d'ammonium 2M. Pour la fixation des protéines sur la colonne, l'extrait E3 est préalablement amené à la concentration finale de 2M en sulfate d'ammonium, puis déposé sur la colonne à un débit de 0,6mL. min⁻¹. Après rinçage de la colonne, les protéines retenues sont éluées par un gradient de 2M à 0M en sulfate d'ammonium dans le tampon d'équilibrage, ceci en 60min. Les peroxydases sont éluées pour une concentration en sulfate d'ammonium de 1M. Les fractions peroxydasiques sont rassemblées en fonction de leur taux de pureté (fraction pures E4). Les fractions non pures sont rassemblées et sont soumises à un autre passage sur la colonne hydrophobe. Comme précédemment, l'élution est enregistrée à 280 et 405nm.

2 - Contrôle de la pureté des peroxydases

a- Caractéristiques spectrales des peroxydases anioniques

Les caractéristiques spectrales d'une solution de peroxydase fournissent une bonne indication quant au degré de pureté de l'enzyme. Plus grande est la pureté, plus le rapport DO405/280 est élevé. Ceci est dû aux propriétés spectrales de l'hème dont l'absorption est maximale à 402-405nm. En pratique le spectre d'absorption est enregistré en continu au spectrophotomètre entre 500 et 200nm. Le rapport DO 405/280 est équivalent à 3 lorsque les peroxydases sont pures.

b - Electrophorèses en conditions "semi-dénaturantes"

Les électrophorèses ont été réalisées en gel de polyacrylamide (1,5mm d'épaisseur) sur plaques verticales de 70mm x 80mm (matériel BIORAD) selon le protocole décrit par Laemmli (1970). Les gels de concentration et de séparation ont une teneur respective en polyacrylamide de 4,5 et 7,5% et en SDS de 0,1% (p/v). L'extrait protéique est mélangé au tampon de charge (Tris-HCl 0,06M pH 6,8 glycérol (10%, v/v), β-mercaptoéthanol (5%, v/v), bleu de bromophénol (0,05%, p/v), SDS (2%, p/v), puis déposé sur le gel sans être dénaturé à 100°C. Dans ces conditions, les protéines ne perdent pas totalement leur activité enzymatique; il est ainsi possible de comparer le positionnement des bandes protéiques et des bandes à activité enzymatique par examen de deux gels révélés respectivement au bleu de Coomassie et au guaïacol/H₂O₂. Le tampon de migration (Tris 0,12M pH 8,3, glycine (7,2%, p/v), SDS (0,5%, p/v) est dilué 5 fois lors de son utilisation. La migration s'effectue à une intensité de 70mA pour deux gels.

c - Estimation des PM: électrophorèse en conditions dénaturantes

Après dénaturation de l'extrait E4 pendant 5min à 100°C dans le tampon de charge décrit ci-dessus, les protéines sont séparées selon leur masse sur le gel de polyacrylamide contenant du SDS (0,1%, p/v). La solution de marqueurs de poids moléculaires (BIORAD) est constituée des 9 protéines suivantes: myosine (200kDa), β-galactosidase (116,25 kDa), phosphorylase B (97,4kDa), albumine de sérum de bovin (66,2kDa), ovalbumine (45kDa), anhydrase carbonique (31kDa), inhibiteur de trypsine de soja (21,5kDa), lysozyme (14,4kDa) et aprotinine (6,5kDa).

d - Révélation des protéines au bleu de Coomassie

Après migration des protéines, le gel est plongé dans une solution de fixation (éthanol à 40%, acide acétique glacial à 10%) pendant 30min. Pour révéler les protéines, le gel est ensuite incubé dans une solution de bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, SERVA) à 0,1% (p/v), éthanol à 45% (v/v), acide acétique à 10% (v/v) pendant 30 min. Après décoloration dans un mélange d'éthanol à 20% (v/v) et d'acide acétique glacial à 10% (v/v), le gel est alors rincé dans de l'eau distillée 2x5min.

e - Détermination du pH optimal d'activité des peroxydases anioniques

Pour déterminer les effets du pH sur l'activité des peroxydases anioniques, les tampons suivants sont utilisés:

- acétate de sodium (0,1M) pour les pH compris entre 4,5 et 5,5;
- phosphate de potassium (0,1M) pour les pH compris entre 5,5 et 8;
- Tris-HCl (0,1M) pour les pH compris entre 8 et 9.

V- Détermination du pH isoélectrique des peroxydases par isoélectrofocalisation (IEF) sur gel

L'IEF est réalisée selon Robertson et al. (1987) sur des plaques verticales 70 x 80mm (BIO-RAD). Pour visualiser la séparation des peroxydases anioniques, le gradient de pH dans le gel est constitué d'un mélange d'ampholytes 2/4 à 1.5 %, 3/6 à 1% et 3/10 à 2.5% commercialisées par Serva. Pour visualiser la séparation des peroxydases cationiques, le gradient de pH dans le gel est compris entre 3 et 11, principalement chargé en ampholytes 9/11 (ampholytes 3/10 à 0.6% et 9/11 à 2.5%). Pour visualiser simultanément la séparation des peroxydases anioniques et cationiques, le gradient de pH dans le gel est constitué uniquement d'ampholytes 3-10 à 4%. Les extraits bruts (30 µg de protéines) sont déposés sur le gel après l'étape d'extraction des peroxydases, centrifugation et filtration du surnageant sur membrane de polysulfone (0,45µm GELMAN Sciences). Le gel est incubé durant quelques minutes dans le milieu réactionnel contenant le guaïacol comme substrat. Les témoins marqueurs de points isoélectriques sont constitués des protéines suivantes: amyloglucanase (pI 3,5), glucose oxydase (pI 4,2), inhibiteur de trypsine de pois (pI 4,5), deux β-Lactoglobulines (pI 5,15 et 5,3), anhydrase carbonique (pI 6), deux myoglobines de cheval (pI 6,9 et 7,35), trois

lectines (pI 7,75; 8,0 et 8,3), la ribonucléase A (pI 9,45) et le cytochrome c (pI 10,65) (Serva Protein Test Mixture).

VI- Déglycosylation des peroxydases anioniques

Afin de vérifier que les multiples bandes d'activité sur gel ne correspondent pas à des glycosylations différentielles d'une seule et même peroxydase, l'extrait des peroxydases anioniques purifiées a été soumis à une déglycosylation. La déglycosylation enzymatique des peroxydases a été effectuée avec le kit BIO-RAD, en utilisant le protocole du fournisseur (Enzymatic déglycosylation kit).

VII- Localisation histochimique de l'activité peroxydasique

L'activité peroxydasique est détectée sur des coupes (20-30 μ m d'épaisseur) de cotylédons frais selon la méthode de Maehly et Chance (1954), en utilisant le guaiacol comme substrat. Après avoir été collectées dans de l'eau distillée, les coupes sont immergées pendant 10min dans la solution suivante: 0,2mL de guaiacol à 0,2% (Sigma), 100mL de tampon citrate phosphate (pH6), 0,1mL d'hydrogène peroxyde à 3% et 1mL de 3 amino-éthyl-carbazole dans du diméthyl formamide.

Un deuxième substrat a été utilisé, la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB Sigma) selon la méthode décrite par Imberty et al. (1984). Les coupes sont incubées dans la solution suivante: 10mg de TMB dissout dans 2,5mL d'éthanol absolu, 47,5mL d'eau distillée, 50mL de tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH 4,5) et 3mL d'hydrogène peroxyde à 3%.

Après incubation, les coupes sont rincées dans de l'eau distillée, et observées au microscope photonique (Diaplan, Leitz). Des témoins sont effectués en incubant des coupes de tissus dans le milieu réactionnel (a) en l'absence d'H₂O₂ ou (b) en ajoutant du 3-amino-1,2,4-triazole (AT) à 0,05M dans le but d'inhiber une éventuelle activité catalase.

La couleur rouge-brun ou bleue indique la localisation de l'activité peroxydasique après utilisation, respectivement du guaiacol et du TMB.

VIII- Analyse moléculaire

Toutes les manipulations ont été effectuées dans les conditions nécessaires à la manipulation d'ARN, c'est-à-dire en l'absence de toute contamination par des RNAses (port de gants fréquemment changés, matériel et solutions traités au DEPC (diethyl pyrocarbonate)).

1. Matériel bactérien et végétal : cinétique d'infestation

La souche de *Xcm* de race 18 a été inoculée au niveau des cotylédons sur les 2 cultivars de cotonnier Acala 44 et Réba B50. Aux temps 0, 2, 3, 4, 6, 12 et 24h suivant l'inoculation, trois cotylédons ont été excisés pour chacun des cultivars, et immédiatement plongés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

2. Extraction des ARN totaux

Les ARN ont été isolés à l'aide du kit RNAeasy Plant (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) à partir de 100mg des cotylédons congelés et broyés dans un mortier dans de l'azote liquide. Les échantillons sont d'abord lysés et homogénéisés en conditions hautement dénaturantes (isothiocyanate de guanidine) qui inactivent les RNAses. Le principe de la purification des ARN totaux réside sur l'utilisation d'une membrane de silica-gel qui fixe préférentiellement les ARN, de taille supérieure à 200 nucléotides, en présence d'un tampon très concentré en sels. Les ARNs sont récupérés par élution dans de l'eau (30-100µL).

3. Dosage et vérification de l'intégrité des ARN

Les ARN ont été dosés par mesure de l'absorbance à 260nm (spectrophotomètre Beckman), en considérant qu'une solution ayant une DO_{260} égale à 1 contient $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ARN. La pureté des ARN a été vérifiée en calculant le rapport A_{260}/A_{280} , qui doit être compris entre 1,7 et 2,0 pour des solutions exemptes de protéines.

L'intégrité des ARN a été vérifiée par électrophorèse de 10µL des extraits en gel d'agarose à 1%. Les gels d'agarose sont réalisés en mélangeant l'agarose dans du tampon TAE (0,04M Tris-acétate; 0,001M EDTA). Cette solution est chauffée au four micro-ondes jusqu'à dissolution, puis, quand l'agarose est refroidi à 50°C, 0,5 µg.mL⁻¹ de bromure d'éthidium sont ajoutés. Le gel est ensuite coulé, refroidi

jusqu'à solidification et placé dans la cuve d'électrophorèse.

Avant d'être déposés dans les puits du gel, les échantillons d'ARN sont mélangés au tampon de migration (20% du volume à déposer) dont la composition de la solution stock à diluer 10 fois est la suivante : Bleu de bromophénol (0,25g), EDTA 0,1M pH 8,0 (100mL), ficoll (20g).

La séparation électrophorétique s'effectue dans du tampon TAE sous courant constant réglé selon le type de gel et la durée de migration voulue. Les ARN sont séparés suivant leur taille. Le bromure d'éthidium contenu dans le gel a la propriété de s'intercaler entre les nucléotides et d'émettre une fluorescence sous lumière ultraviolette.

4. Préparation de "dot-blots"

Les ARN sont d'abord dénaturés par chauffage à 95°C pendant 2min, refroidis immédiatement dans la glace pendant 5min, puis sont déposés directement sur une membrane de Nylon N+ (Amersham, France). Après séchage, les ARN sont fixés aux membranes par incubation à 80°C pendant 2h et les membranes sont conservées à - 20°C jusqu'à hybridation.

5. Hybridation de la sonde cDNA "peroxydase"

Nous avons utilisé le clone plasmidique Pcn1 (Buffard et al., 1990) (de taille 1700 paires de bases) contenant un ADN complémentaire de peroxydase anionique d'arachide, pour suivre l'expression des ARN messagers de peroxydase au cours de la cinétique d'infestation du cotonnier par *Xcm*.

a. marquage radioactif

L'ADNc (50ng) est marqué par l'incorporation d'un nucléotide radioactif ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) selon la technique de "random priming" (Multiprime DNA Labelling Kit, Amersham). L'ADN est soumis à une réaction de polymérisation enzymatique à 37°C au bain-marie, pendant 1h.

b. hybridation des sondes

L'hybridation de l'ADNc sur les ARN déposés sur le dot-blot est précédée d'une préhybridation de la membrane afin de saturer les sites de fixation non spécifiques de l'ADN sur la membrane et de ne laisser accessibles à la sonde que les séquences d'ARN déposées. Les deux étapes sont réalisées dans des tubes d'hybridation en Pyrex, mis en rotation continue dans une étuve à hybridation (Appligène). Les membranes à préhybrider sont placées dans le tube

d'hybridation contenant environ $5\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}$ de membrane d'un tampon de préhybridation (commercialisé par Amersham sous forme de pastilles à raison d'une pastille pour 10mL d'eau distillée stérile et pour 100 cm^2 de membrane). La préhybridation s'effectue à 65°C pendant 0,5h.

Après la préhybridation, la sonde marquée double brin est dénaturée pour être sous forme simple brin pendant 5min à 95°C , puis gardée 5min dans la glace. Elle est alors introduite dans le tube d'hybridation et s'hybridera à l'ARN qui possèdent des séquences complémentaires à la sienne. L'hybridation s'effectue à 65°C pendant 14 à 16h, dans le tampon de préhybridation.

c. lavages, exposition

Nous avons utilisé des conditions de lavage des membranes de moyenne stringence favorisant une hybridation de la sonde "peroxydase" hétérologue sur des séquences ayant 60 à 100% d'homologie. Les membranes sont ainsi rincées avec environ 100mL de :

- 2 x SSC, 0,1 % SDS pendant 15min à température ambiante
- 1 x SSC, 0,1 % SDS pendant 20min à 50°C .

Les tampons 2 x SSC, et 1 x SSC sont préparés à partir d'une solution mère de 20 x SSC (citrate de sodium 0,3 M ; NaCl 3M, pH 7,0)

Les membranes sont ensuite enveloppées dans un film plastique et disposées dans une cassette d'autoradiographie en présence de films d'autoradiographie (Amersham) et d'écrans intensificateurs. La cassette est placée à -80°C pour une exposition de quelques heures à plusieurs jours selon la quantité de rayons beta mesurée au compteur Geiger. Les films sont ensuite révélés.

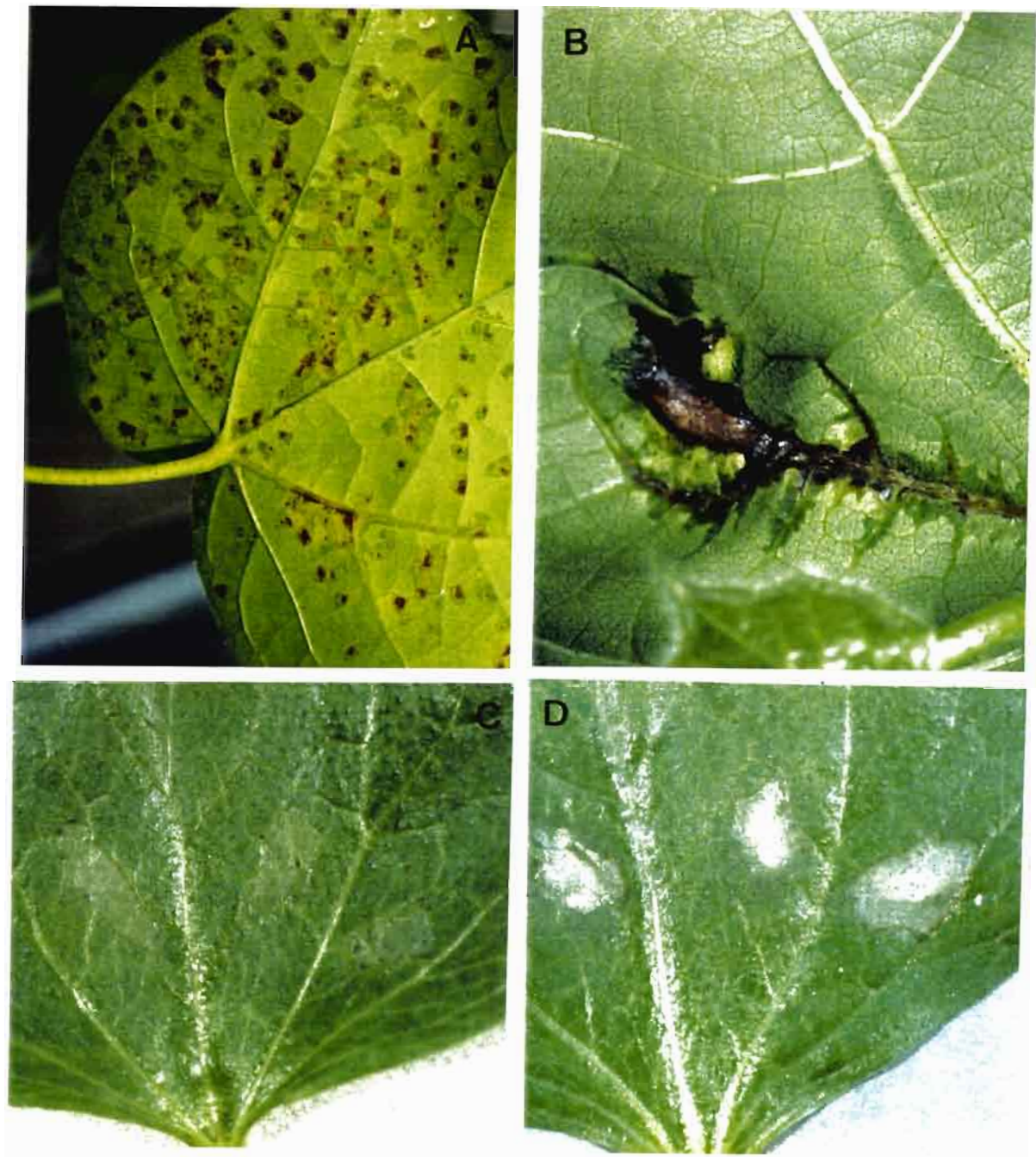


Figure 1: Dix jours après infection de la variété sensible Acala 44 avec *Xcm* race 18, des lésions angulaires à l'aspect huileux apparaissent le long des nervures des cotylédons (A) puis progressent le long des tiges jusqu'aux feuilles causant la mort de la plante 30 jours après l'inoculation. Les lésions peuvent également apparaître le long d'une nervure en l'absence de tâches anguleuses précises (vein-blight) (B). La variété Réba B50 différencie une réaction hypersensible qui se caractérise, 8 à 10h après l'infection par *Xcm* race 18 par une zone nécrotique hypersensible (apparition de la nécrose: 10h après l'inoculation (C); aspect des lésions 24h après l'inoculation (D)).

RESULTATS

I - Description comparée des symptômes

Dix jours après infiltration de la suspension de *Xcm* race 18 dans les cotylédons, des lésions anguleuses d'aspect huileux apparaissent tout au long des nervures chez la variété sensible Acala 44 (Figure 1A). Ces lésions se transforment en nécroses, s'élargissent, puis progressent jusqu'à la tige. Environ trente jours après inoculation, les cotylédons puis les feuilles tombent et la plante meurt. Les mêmes symptômes sont observés lorsque la variété Reba B50 est inoculée avec *Xcm* race 20. Après infiltration de *Xcm* race 18 dans les cotylédons de la variété Reba B50, celle-ci réagit en développant une réaction hypersensible qui se signale dès 11h après l'infection, par une zone nécrotique autour du point d'inoculation (Figure 1 C, D).

II - Evaluation du nombre de bactéries dans les cotylédons infectés

Durant les deux premiers jours de l'infection, la multiplication bactérienne est pratiquement identique dans les deux systèmes compatibles (Réba B50/ *Xcm* race 20; Acala 44/ *Xcm* race 18) et incompatible (Réba B50/ *Xcm* race 18) (Tableau 1). Alors que la population bactérienne atteint rapidement un palier dans le système incompatible, les bactéries continuent à se multiplier dans les systèmes compatibles, conjointement à l'apparition des symptômes. On notera, cependant, que la densité bactérienne observée dans les cotylédons de la variété Réba B50 inoculée avec *Xcm* race 20 est toujours inférieure à celle observée dans les cotylédons de la variété Acala 44 inoculés par *Xcm* race 18 ou 20.

III - Evolution quantitative des protéines totales dans les tissus foliaires durant l'infection

La teneur en protéines totales des cotylédons inoculés de la variété Réba B50 chute rapidement dès 10h après l'inoculation par *Xcm* race 18, alors que dans le cas des réactions de type compatible, la teneur en protéines totales ne décroît qu'à

	JOURS APRES INOCULATION	SYMPTOMES	ACTIVITE PEROXYDASE (1)		DENSITE BACTERIENNE (2)
			cotylédons	feuilles	cotylédons
	0	HR t=8h	400 ± 49	69 ± 20	2.2 ± 0.5
	1	HR	872 ± 44	73 ± 12	6.6 ± 0.8
	2		2165 ± 540	189 ± 7	70 ± 10
Reba B50	3		3685 ± 200	267 ± 36	150 ± 12
/	4		3807 ± 204	374 ± 34	200 ± 14
Xcm race 18	7		4280 ± 77	588 ± 56	250 ± 28
	8		5202 ± 70	727 ± 73	239 ± 31
	9		3262 ± 71	963 ± 62	150 ± 17
	10	mort des cotylédons	/	950 ± 56	/
	0	°	393 ± 68,5	69 ± 16	2 ± 0.5
	1	°	750 ± 42	59 ± 10	7 ± 0.7
	2	°	695 ± 93	64 ± 25	90 ± 9
Reba B50	3	°	1232 ± 150	224 ± 28	415 ± 35
/	4	lésions	1310 ± 112	322 ± 21	3000 +/- 25
Xcm race 20	7	-	1399 ± 62	404 ± 34	3700 ± 24
	8	-	1410 ± 43	565 ± 56	3980 ± 15
	9	-	1082 ± 42	430 ± 27	3500 ± 37
	10	mort des cotylédons	/	379 ± 27	/
	0	°	244 ± 59	23,5 ± 3	2 ± 0.06
	1	°	71 ± 17	15,5 ± 7	8.2 ± 0.5
	2	°	581 ± 75	48 ± 20	99 ± 10
Acala 44	3	°	596 ± 38	49 ± 12	510 ± 35
/	4	lésions	575 ± 35	54 ± 13	3700 ± 52
Xcm race 18	7	-	445 ± 25	43 ± 7,4	4830 ± 32
	8	-	430 ± 15	27 ± 5	5210 ± 56
	9	-	431 ± 13	30 ± 3	4890 ± 28
	10	mort des cotylédons	/	21 ± 8	/

Tableau 1: Evolution de l'activité peroxydasique en fonction du temps dans les feuilles et les cotylédons des deux variétés de cotonnier après inoculation des cotylédons par Xcm, et évolution des populations bactériennes dans les cotylédons. Seuls les cotylédons sont infiltrés par Xcm race 18 ou 20. A chaque temps de prélèvement, les cotylédons et les premières feuilles du rang supérieur sont analysés.

(1) l'activité peroxydasique est exprimée en nKat/mg de protéines

(2) la densité bactérienne est exprimée en cfu x 10⁵/cm² de tissu cotylédonnaire

Les moyennes et écart-types sont effectués à partir des résultats obtenus indépendamment sur 10 individus.

l'apparition des symptômes et à la chute des cotylédons, soit environ 30 jours après l'inoculation (Figure 2).

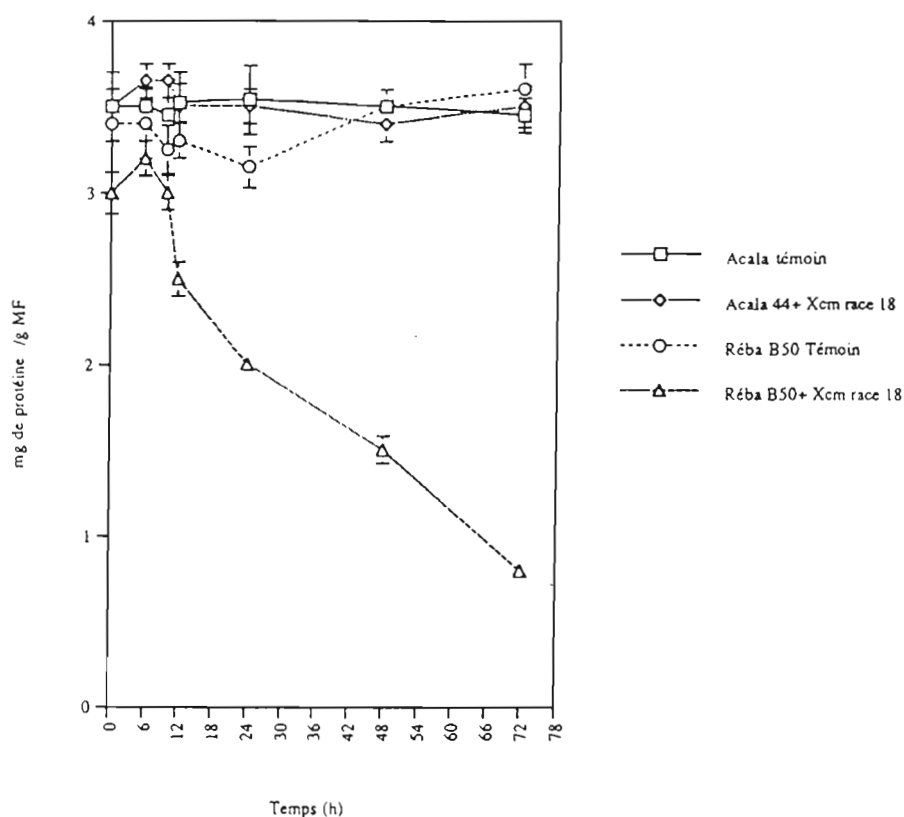


Figure 2: Cinétique de la teneur en protéines totales des cotylédons des variétés Acala 44 et Réba B50 inoculées par Xcm race 18

A chaque temps et pour chaque variété, les cotylédons ont été infiltrés avec *Xcm* race 18. Parallèlement, un lot de plantules a été infiltré avec de l'eau stérile (témoin). Le dosage est effectué selon la méthode de Bradford (1976). Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir des résultats obtenus indépendamment sur 10 individus.

IV - Détection et localisation de l'activité peroxydasique par empreintes de tissus foliaires sur membrane de nitrocellulose

Dix heures après l'infection, on remarque que l'empreinte laissée par la variété Réba B50 infectée par *Xcm* race 18 (interaction incompatible) révèle une forte activité peroxydasique localisée aux points d'infiltration des bactéries, à l'emplacement où la zone tissulaire évoluera en RH (Figure 3B). Lorsque les cotylédons sont infiltrés avec de l'eau, on observe très peu d'activité aux sites

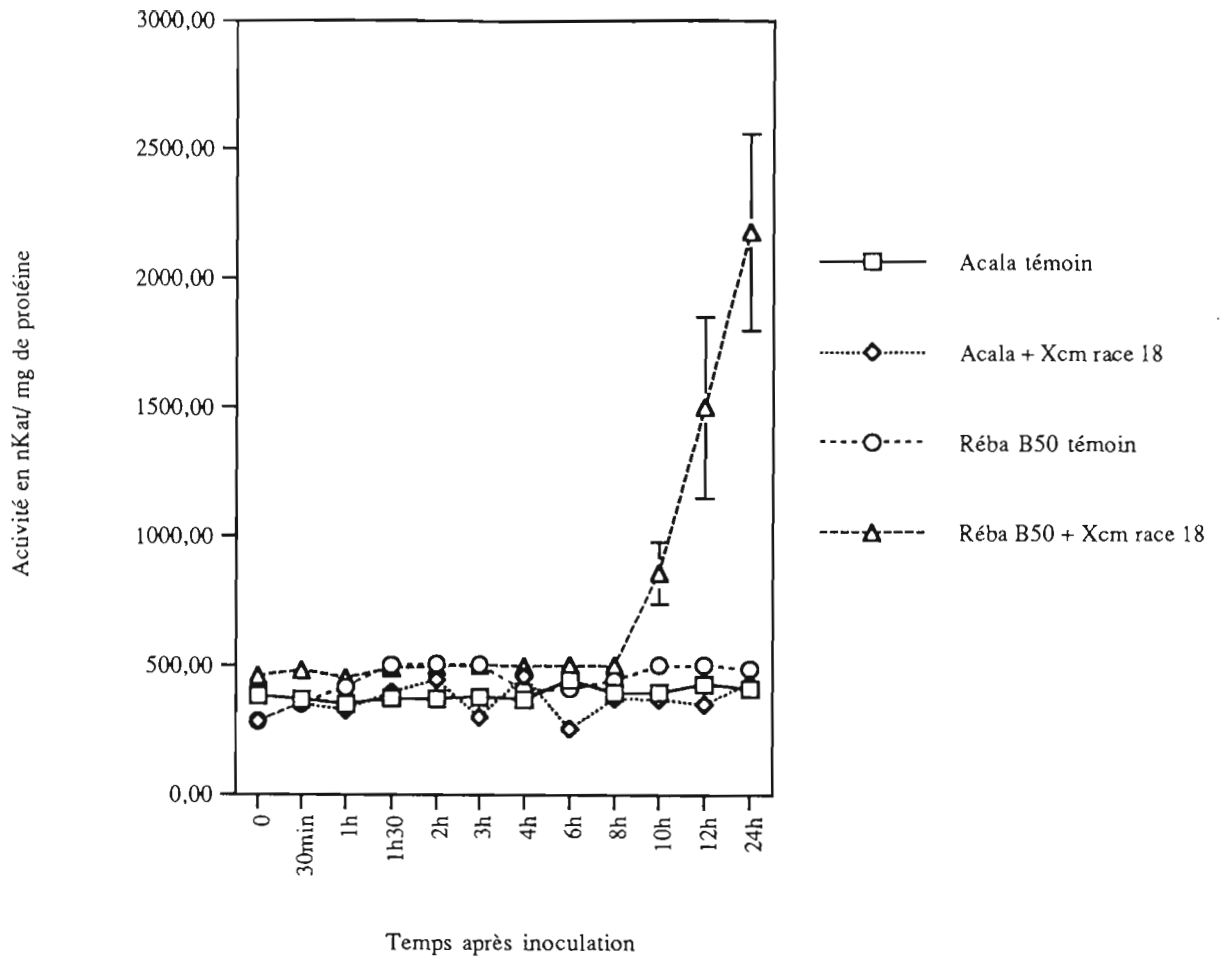


Figure 4: Evolution de l'activité peroxydasique totale dans les cotylédons des deux variétés Réba B50 et Acala 44 dans les vingt-quatre heures suivant l'inoculation par *Xcm* race 18.

Les cotylédons ont été infiltrés par une suspension bactérienne de *Xcm* race 18 (10^8 ufc/mL). Parallèlement, un lot de plantules a été infiltré avec de l'eau stérile (témoin). L'activité peroxydasique est testée à température ambiante en utilisant le guaiacol comme substrat. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir des résultats obtenus indépendamment sur 10 individus.

d'infiltration (Figure 3A). De même, dix heures après infection, pour la variété sensible Acala 44 inoculée avec *Xcm* race 18 et la variété Réba B50 inoculée avec *Xcm* race 20, seule une très faible activité peroxydasique est visible aux sites correspondant aux points d'inoculation.

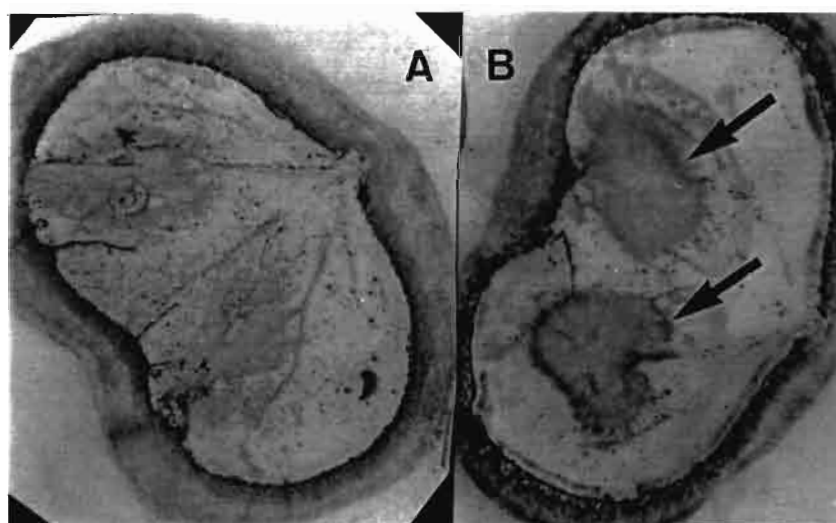


Figure 3: Empreintes de tissus foliaires sur membrane de nitrocellulose

L'activité peroxydasique est révélée sur des empreintes de cotylédons de la variété Réba B50 réalisées après infiltration par: de l'eau stérile (A); une suspension de *Xcm* race 18 (10^8 ufc/mL) (B).

L'activité peroxydasique est détectée visuellement dès dix heures après l'inoculation (flèches) sur les sites de la RH.

V - Evolution de l'activité peroxydasique

1- Variations de l'activité peroxydasique dans les cotylédons inoculés par *Xcm*

Dix heures après inoculation avec *Xcm* race 18, l'activité peroxydasique augmente de façon significative chez la variété résistante (Figure 4). Vingt quatre heures après l'infection, elle est près de 5 fois supérieure à celle des plants de la variété sensible Acala 44; l'activité continue à augmenter jusqu'à 8 jours après l'inoculation (activité maximale multipliée par un facteur 13 par rapport au temps 0) (Tableau 1). Lorsque la variété Réba B50 est inoculée avec *Xcm* race 20 qui surmonte sa résistance, on note une faible augmentation de l'activité

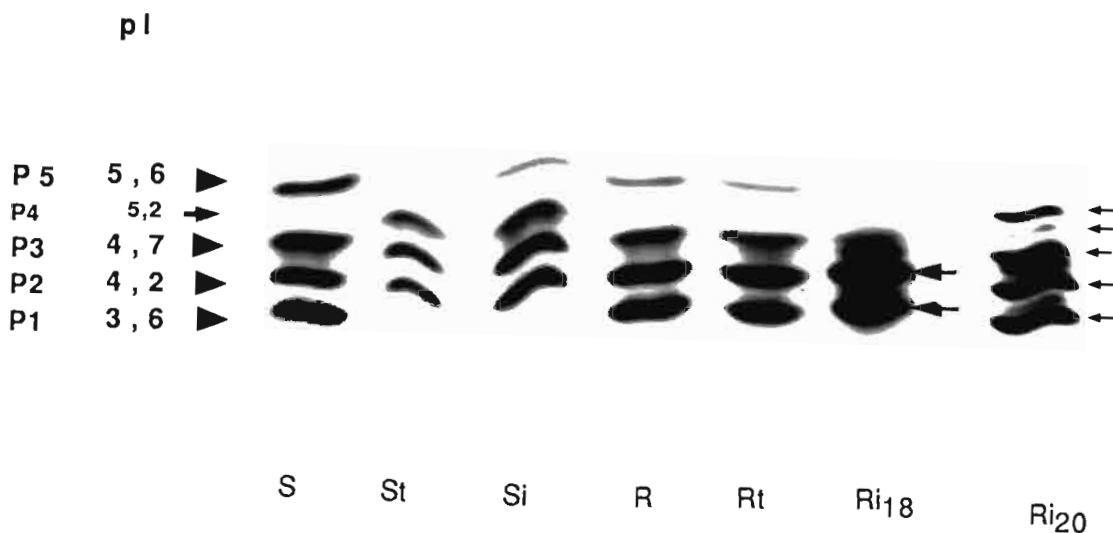


Figure 5: Détermination du profil enzymatique par IEF des peroxydases anioniques extraites des cotylédons des variétés Réba B50 et Acala 44 après inoculation par *Xcm*.

Les cotylédons sont soit infiltrés avec *Xcm* race 18 ou 20, soit avec de l'eau stérile, ou encore laissés intacts. Les prélèvements ont été effectués dix heures après les traitements. Trente microgrammes de protéines contenues dans l'extrait brut ont été déposés par puit.

S-Acala 44 sans traitement; **St**- Acala 44 témoin infiltré avec de l'eau stérile; **Si**- Acala 44 inoculé par *Xcm* race 18;

R-Réba B50 sans traitement; **Rt**- Réba B50 témoin infiltré avec de l'eau; **Ri₁₈**, **Ri₂₀**-Réba B50 inoculé avec *Xcm* race 18 ou 20.

Chez la variété Réba B50 inoculée par *Xcm* race 18 (interaction incompatible), l'activité des isoformes de pI 3,6 et 4,2 (P1 et P2) augmente considérablement à partir de dix heures après l'inoculation. Lorsque cette même variété est inoculée par *Xcm* race 20, les cinq isoenzymes anioniques sont stimulées (P1 à P5).

peroxydasique (augmentation d'un facteur 3,6 par rapport au temps 0, huit jours après l'inoculation) (Tableau 1).

Chez la variété sensible Acala 44 inoculée avec *Xcm* race 18 (ou 20), on observe peu de variation de l'activité peroxydasique dans le temps (augmentation d'un facteur 2,3 par rapport au temps 0) 3 jours après l'inoculation; l'activité décroît progressivement dès le quatrième jour après l'inoculation (Tableau 1).

2 - Variations de l'activité peroxydasique dans les feuilles non inoculées

Parallèlement aux mesures effectuées dans les cotylédons, l'activité peroxydasique a été mesurée sur les mêmes plants dans les feuilles - non inoculées - de l'étage foliaire situé immédiatement au-dessus des cotylédons (Tableau 1). On observe chez la variété Réba B50 inoculée avec *Xcm* race 18 une augmentation d'activité dans les feuilles à partir de 48h après l'inoculation. Cette activité augmente progressivement jusqu'à 9 jours après l'infection (augmentation d'activité d'un facteur 14 par rapport au temps 0). L'activité mesurée dans les feuilles est néanmoins 5 à 10 fois inférieure à celle mesurée dans les cotylédons pour la variété Réba B50. Chez cette dernière, inoculée avec la race 20, on note une augmentation d'activité peroxydasique intermédiaire jusqu'à 8 jours après l'inoculation (augmentation d'un facteur 8 par rapport au temps 0).

Chez la variété sensible Acala 44 inoculée avec *Xcm* race 18, on observe une faible augmentation d'activité dans les feuilles 48h après l'inoculation (augmentation d'un facteur 2 par rapport au temps 0). Cette activité décroît ensuite rapidement jusqu'à son niveau de base (temps 0) (Tableau 1).

A noter que:

* jusqu'au quatrième jour, l'évolution de l'activité enzymatique dans les feuilles des plants de la variété Réba B50 inoculées par *Xcm* race 20 est peu différente de celle des plants de la même variété inoculée par *Xcm* race 18, alors que, dans les cotylédons, l'activité est trois fois plus faible dans le premier cas (Réba B50/ *Xcm* race 20) par rapport au second (Réba B50/ *Xcm* race 18).

* chez la variété Acala 44, qu'il s'agisse des cotylédons ou des feuilles, les variations d'activité en fonction du temps post-inoculations sont négligeables.

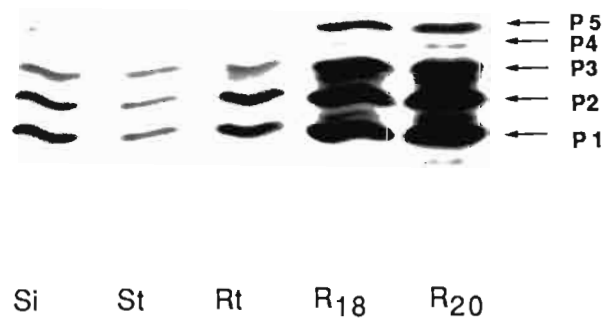


Figure 6: Détermination du profil enzymatique par IEF des peroxydases anioniques extraites des premières feuilles des variétés Réba B50 et Acala 44 après inoculation des cotylédons par *Xcm*:

Les peroxydases sont extraites des premières feuilles non traitées après infiltration des cotylédons avec de l'eau stérile, ou après inoculation par *Xcm* race 18 ou race 20. Trente microgrammes de protéines contenues dans l'extrait brut ont été déposés par puit.

Si- Feuilles de la variété Acala 44 dont les cotylédons ont été inoculés par *Xcm* race 18; **St-** Feuilles de la variété Acala 44 dont les cotylédons (témoins) ont été infiltrés avec de l'eau stérile; **Rt-** Feuilles de la variété Réba B50 dont les cotylédons (témoins) ont été infiltrés avec de l'eau stérile; **R 18, R 20-** Feuilles de la variété Réba B50 dont les cotylédons ont été inoculés avec *Xcm* race 18 ou race 20.



Figure 7: Mise en évidence du profil enzymatique des peroxydases cationiques extraites des cotylédons des variétés Acala 44 et Réba B50.

Trente microgrammes de protéines contenues dans l'extrait brut ont été déposés par puit. Le gradient de pH dans le gel est constitué uniquement d'ampholytes 3-10.

S- Variété Acala 44; **R-** Variété Réba B50

VI - Mise en évidence d'isoperoxydases chez le cotonnier

1 - Les peroxydases anioniques des cotylédons

a - dans les plantes témoins (infiltrées avec de l'eau, ou non traitées)

Cinq bandes d'activité peroxydasique (de pI 3,6; 4,2; 4,7; 5,2 et 5,6 nommées respectivement P1, P2, P3, P4 et P5) ont été mises en évidence dans les cotylédons de cotonniers après IEF sur gel de polyacrylamide (Figure 5). Des profils identiques sont obtenus que les cotylédons proviennent des variétés Acala 44 ou Réba B50, et qu'ils aient été infiltrés par de l'eau ou non traités.

b - dans les plantes inoculées avec Xcm race 18 ou race 20

Chez la variété Réba B50 inoculée par Xcm race 18 (interaction incompatible), l'activité des isoformes de pI 3,6 et 4,2 (P1 et P2) augmente considérablement à partir de 10h après l'inoculation (Figure 5). Dans le cas de la réaction de type compatible (Réba B50/Xcm race 20), les cinq isoformes sont stimulées.

2 - Les peroxydases anioniques dans les feuilles non traitées

Parallèlement à l'analyse du profil enzymatique par IEF pendant la cinétique d'infection dans les cotylédons, un profil enzymatique identique a été mis en évidence dans les extraits de feuilles non inoculées situées au-dessus des cotylédons. Quarante huit heures après inoculation des cotylédons de la variété Réba B50 par Xcm race 18 ou 20, l'activité de toutes les cinq isoformes augmente dans les feuilles, et pas seulement celle des isoformes P1 et P2 de pI 3,6 et 4,2 (Figure 6).

3 - Les peroxydases cationiques

a - dans les plantes "contrôles" (infiltrées avec de l'eau, ou non traitées)

Deux bandes d'activité peroxydasique de faible intensité (pI 7,2 et 9,45 nommées P6 et P7) ont été mises en évidence par IEF dans les extraits des deux variétés non traitées (Figure 7). Après infiltration avec de l'eau stérile, aucune variation apparente d'intensité d'activité des deux isoenzymes n'est observée.

b - dans les plantes inoculées

Chez la variété Réba B50 inoculée par Xcm race 18, on observe, 3h après inoculation, on observe une augmentation d'activité correspondant à l'isoforme P7 (Figure 8). Cette activité ponctuelle revient rapidement à son niveau de base

dès 4h après l'infection, puis augmente à nouveau progressivement à partir de 24h après inoculation. Chez la variété Réba B50 inoculée par *Xcm* race 20, ou la variété Acala 44 inoculée par *Xcm* 18 ou 20, aucune variation d'activité de l'isoforme P7 n'est décelée.

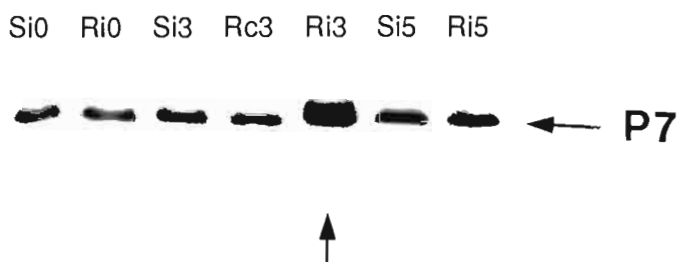


Figure 8: Evolution sur gel d'IEF de l'activité des peroxydases cationiques extraites des cotylédons des variétés Réba B50 et Acala 44 après leur inoculation par *Xcm* race 18.

Si0- cotylédons de la variété Acala 44 inoculés par *Xcm* race 18, et prélevés immédiatement après inoculation; **Ri0**- cotylédons de la variété Réba B50 inoculés par *Xcm* race 18, et prélevés immédiatement après inoculation; **Si3**- cotylédons de la variété Acala 44 inoculés par *Xcm* race 18, et prélevés 3h après inoculation; **Rc3**- cotylédons de la variété Réba B50 infiltrés avec de l'eau, et prélevés 3h après inoculation; **Ri3**- cotylédons de la variété Réba B50 inoculés par *Xcm* race 18, et prélevés 3h après inoculation; **Si5**- cotylédons de la variété Acala 44 inoculés par *Xcm* race 18, et prélevés 5h après inoculation; **Ri5**- cotylédons de la variété Réba B50 inoculés par *Xcm* race 18, et prélevés 5h après inoculation.

VII - Purification des peroxydases anioniques; contrôle de pureté des peroxydases

1 - Essai de séparation des isoenzymes anioniques

De très nombreuses techniques et "stratégies" de purification ont été testées. Très rapidement le choix s'est porté sur une succession de trois étapes (Tableau 2):

Etapas de purification	[Protéines]	Activité peroxydasique	R
	mg/ml	nKat/mg protéine	A405/A280
Extrait brut	2	600	/
Précipitation à l'acétone	0,5	1500	0,03
Colonne Q	0,2	11000	1,8
Colonne hydrophobe	0,1	20000	3

Tableau 2: Etapes de purification des peroxydases anioniques extraites des cotylédons de la variété Réba B50 après inoculation par *Xcm* race 18.

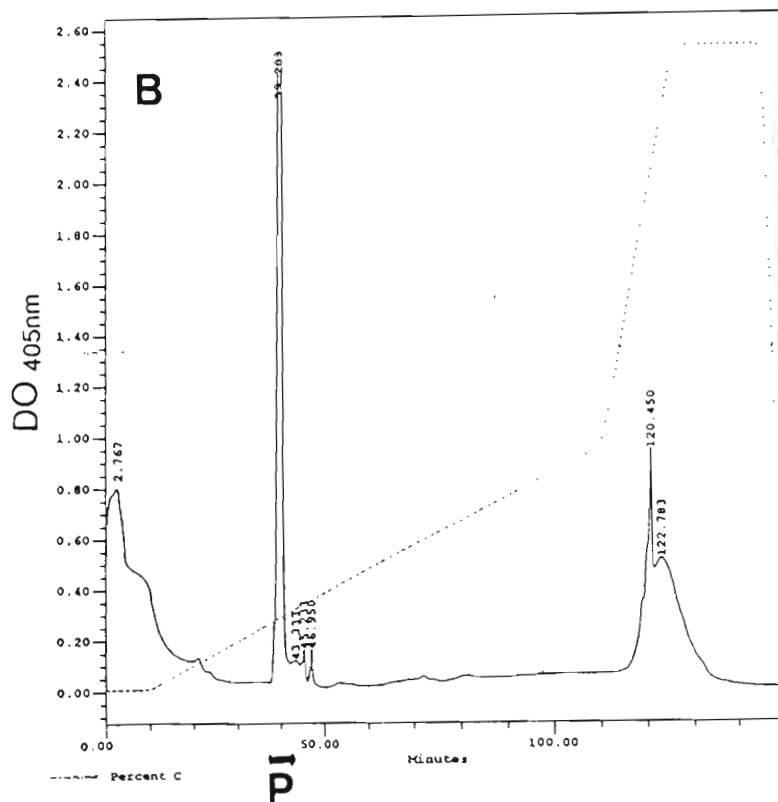
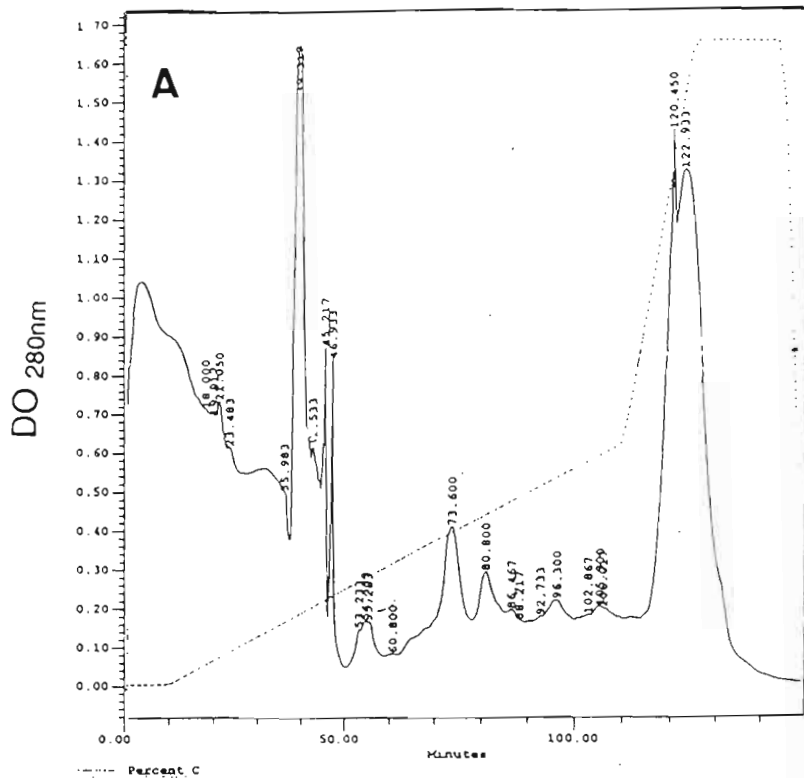
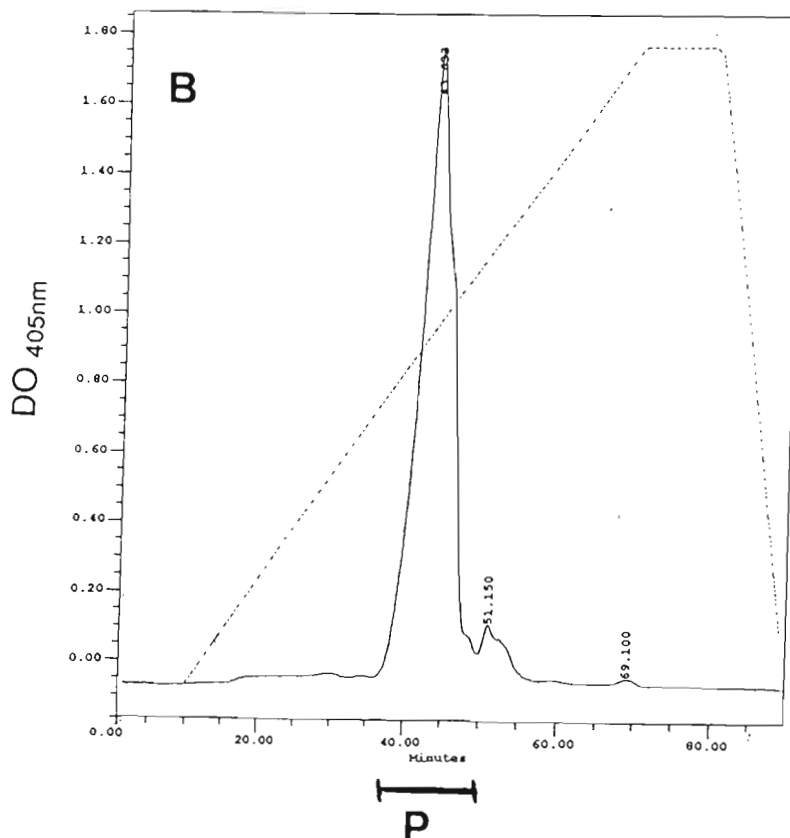
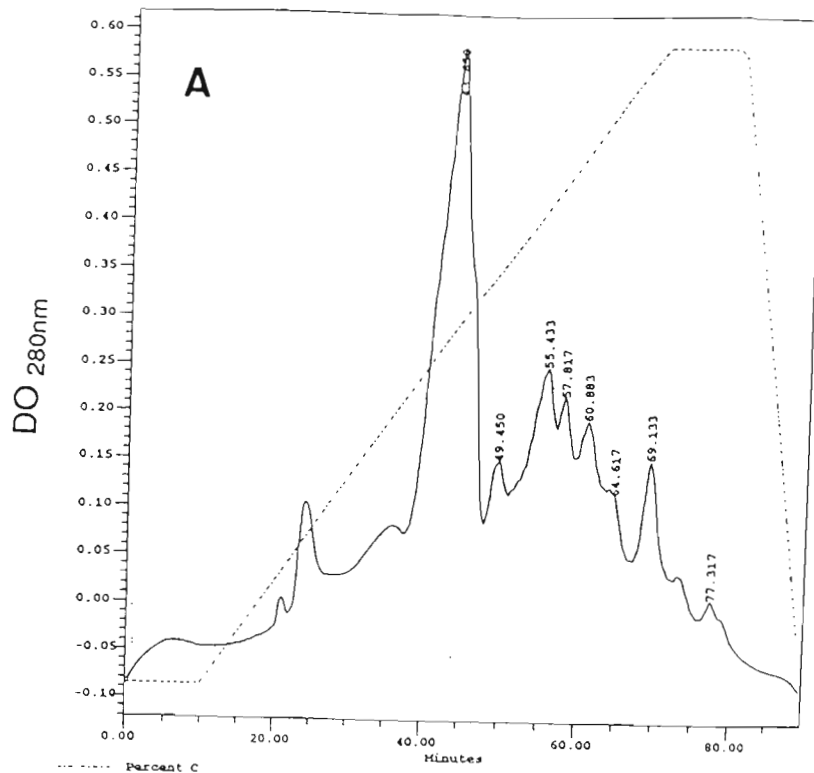


Figure 9A et 9B: Séparation des protéines par chromatographie sur colonne Q.
 La colonne est équilibrée dans un tampon Tris 0.25M (pH 7,5). Après précipitation à l'acétone, l'extrait (6mL) est déposé sur la colonne. Après rinçage des protéines non retenues, l'élué est réalisée par un gradient de 0 à 0,35M NaCl dans le tampon d'équilibrage. Les fractions contenant l'activité peroxydasique sont éluées à 0,1M de NaCl.
 Temps d'élué: 100min.; débit: 1,5mL/min.; volume des fractions: 1,5mL.
 (A) enregistrement à 280nm (protéines); (B) enregistrement à 405nm; (P) activité peroxydasique.



Figures 10A et 10B: Séparation des protéines par chromatographie sur colonne à interaction hydrophobe.

La colonne hydrophobe est équilibrée dans du tampon phosphate de potassium 50mM (pH7), en présence de sulfate d'ammonium 2M. L'extrait est préalablement amené à la concentration finale de 2M en sulfate d'ammonium, puis déposé sur la colonne. Les protéines fixées sur la colonne sont éluées par un gradient inverse de concentration en sulfate d'ammonium (de 2M à 0M) dans le tampon d'équilibrage. Les peroxydases sont éluées à 1M.

Temps d'élué: 60min.; débit 0,5mL/min.; volume des fractions: 0,5mL.

(A) enregistrement à 280nm (protéines); (B) enregistrement à 405nm; (P) activité peroxydasique.

- précipitation fractionnée à l'acétone (l'utilisation du sulfate d'ammonium n'ayant pas donné satisfaction en raison du faible taux de récupération des peroxydases),

- colonne échangeuse d'anions [colonne de type Q (ammonium quaternaire)] (Figures 9A, B);

- colonne hydrophobe (Figures 10A, B).

Des purifications fondées sur ce schéma nous ont donné satisfaction sur un point : l'élimination des protéines non désirées et donc l'obtention d'une fraction peroxydasique pure comme l'atteste la qualité du spectre obtenu (Figure 11) et la valeur, assez exceptionnelle, du rapport des DO405/DO280 (Tableau 2).

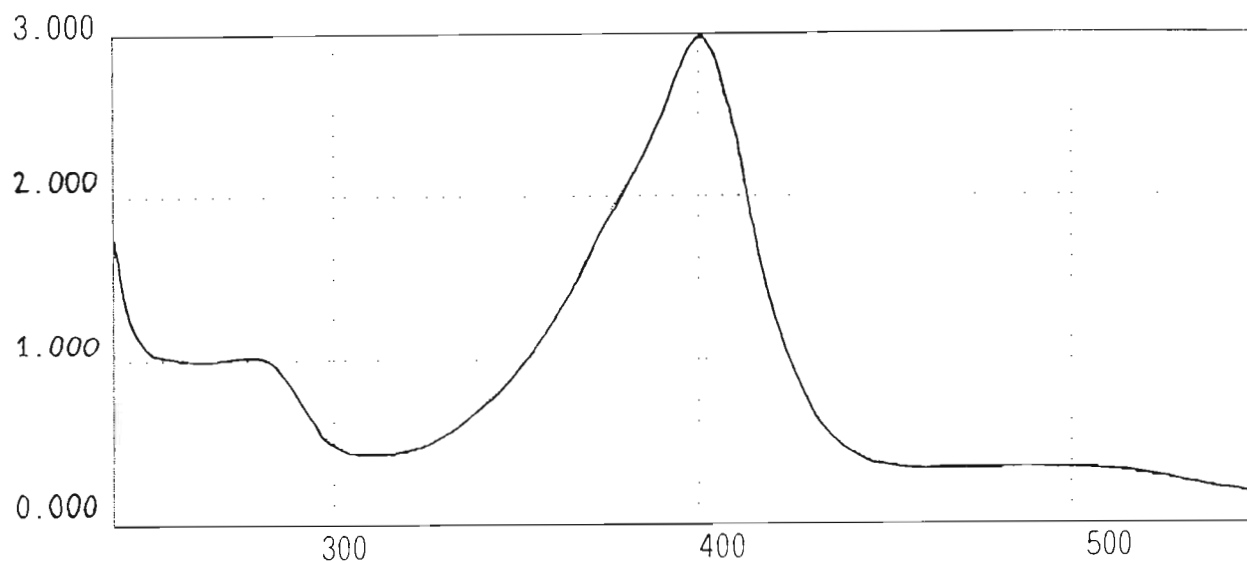
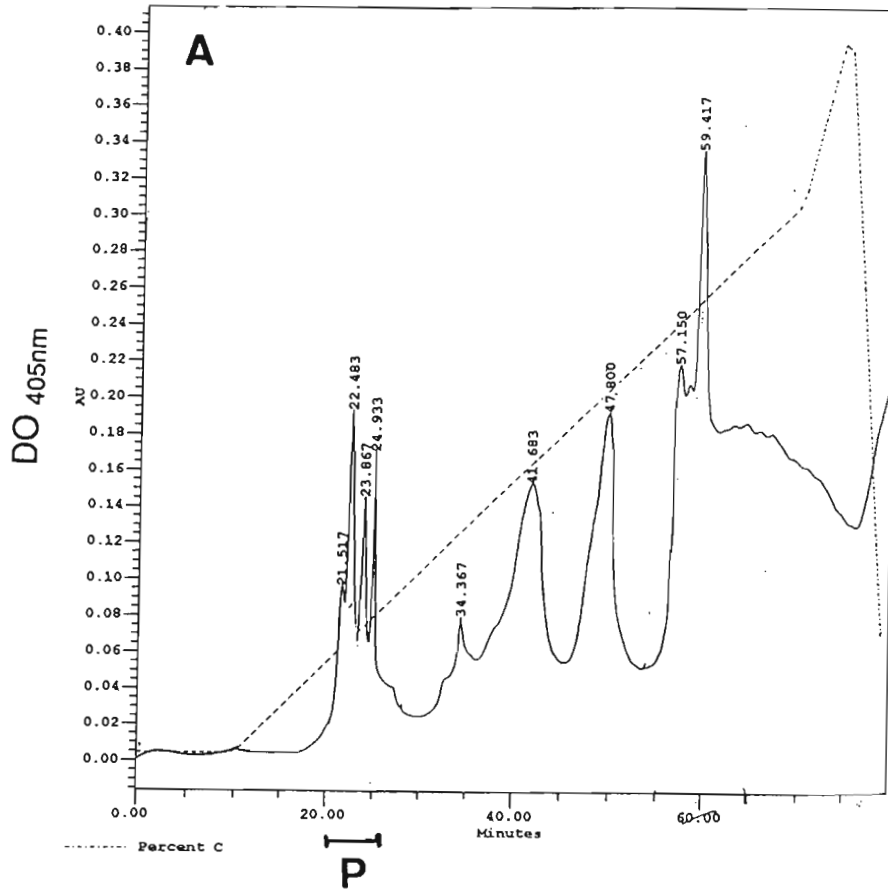


Figure 11: Spectre d'absorption d'une fraction de peroxydase purifiée.

Les caractéristiques spectrales ont été mesurées entre 200 et 500nm. Dans le cas particulier présenté, la valeur du rapport des DO 405nm/DO280nm est égale à 3.

Les figures 9 (A et B) et 10 (A et B) présentent un exemple de diagrammes d'élution, enregistrés respectivement à 280 et 405 nm, sur colonne Q (placée en seconde étape après la précipitation acétonique) et sur colonne hydrophobe (dépôt des fractions "Q" de 38 à 44) venant en dernière étape.

En revanche, nous n'avons jamais réussi à séparer les différentes isoenzymes, malgré la mise en oeuvre d'autres méthodes telles que



B



N° de fraction

21 22 23 24 25 26

Figures 12A 12B: Essai de séparation des isoperoxydases anioniques par chromatographie sur colonne Q, et contrôle par IEF.

La colonne est équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0.25M (pH6). Un extrait brut est déposé sur la colonne. Après rinçage des protéines non retenues, l'élué est réalisé par un gradient de 0 à 0,8M de NaCl dans le tampon d'équilibrage.

Temps d'élué: 60min.; débit: 1,5mL/min.; Volumes des fractions: 1,5mL. Les fractions contenant l'activité peroxydase sont éluées entre 0,15M et 0,2M en NaCl. L'élué est enregistrée en continu à 405nm (A); activité peroxydasique (P). Chaque fraction manifestant une activité peroxydasique est déposée sur gel d'IEF (B).

l'électrofocalisation en veine liquide (système Rotofor/Biorad) ou la chromatofocalisation sur colonne (colonne MonoP/Pharmacia); pourtant, ces dernières méthodes, fondées sur le même principe que l'IEF en gel de polyacrylamide qui nous a permis de mettre en évidence l'existence d'isoformes, auraient dû être efficaces. Au mieux avons-nous réussi à enrichir des fractions en certaines isoformes, mais fréquemment une étape supplémentaire, destinée à parfaire cet enrichissement, aboutissait au résultat inverse, à savoir la réapparition d'isoformes supposées éliminées, sans que l'on puisse proposer une explication claire de ce phénomène. De même, alors qu'un passage sur échangeur d'ions conduisait à la séparation en plusieurs pics (à 405nm), une IEF démontrait la présence des mêmes isoformes dans chacun d'entre eux ou un simple enrichissement en une ou plusieurs isoformes. La figure 12A et B illustre partiellement ce type de situation (chromatographie sur Q; dépôt : extrait brut non pré-purifié par précipitation acétonique fractionnée) : l'enregistrement à 405nm (Figure 12A) et les tests enzymatiques révèlent que les peroxydases sont éluées en 4 pics groupés mais bien distincts (les autres pics n'ont pas d'activité peroxydasique; il s'agit probablement de pigments et molécules diverses absorbant à 405nm) laissant présager d'une bonne qualité de séparation, supposition démentie par l'IEF en gel de polyacrylamide (Figure 12B). Il faut également noter qu'après purification, des bandes supplémentaires apparaissent (Figure 12B, exemple : la fraction 22 présente 7 bandes d'activité) qui ne sont pas visibles sur gel avant purification.

Pour la détermination de certaines caractéristiques physico-chimiques des peroxydases, des préparations purifiées (en trois étapes comme indiqué plus haut) ont été utilisées.

2 - Caractéristiques spectrales des peroxydases

La figure 11 présente le spectre d'absorption d'une préparation purifiée; ce spectre est tout à fait classique pour une peroxydase :

- deux maxima d'absorption, l'un à 402nm dû à la présence de l'hème, l'autre "aplatis" (c'est habituel chez les peroxydases) à 280nm commun à toutes les protéines,

- un épaulement à 375nm,

- un minimum à 310nm (un autre à peine marqué à 255nm).

L'existence de deux maxima d'absorption est à l'origine d'une technique

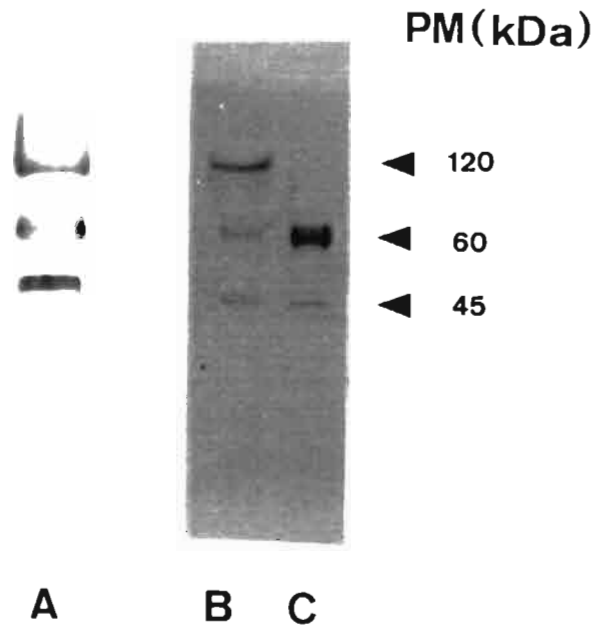


Figure 13: Contrôle de pureté et détermination du PM.

Après purification, l'extrait est déposé sur gel de polyacrylamide riche en SDS en condition strictement dénaturante, ou semi-dénaturante.

A- L'extrait protéique purifié (5 μ g) est déposé avec son tampon de charge (Tris-HCl 0,06M pH 6,8 glycérol (10% (v/v)), β -mercaptoéthanol (5% (v/v)), bleu de bromophénol (0,05% (p/v)), SDS (2% (p/v)) sans être dénaturé à 100°C. Le gel est incubé dans le guaïacol 1min.

B- Afin de pouvoir contrôler que les protéines manifestant une activité peroxydasique correspondent aux seules protéines présentes sur gel, le même extrait (20 μ g) est déposé dans les mêmes conditions et le gel est révélé au Bleu de Coomassie.

C- Vingt microgrammes du même extrait purifié sont déposés après dénaturation pendant 5min. à 100°C dans le tampon de charge décrit ci-dessus.

Le tampon de migration et le gel contiennent dans tous les cas respectivement 0,05%, (p/v) et 0,1% (p/v) de SDS.

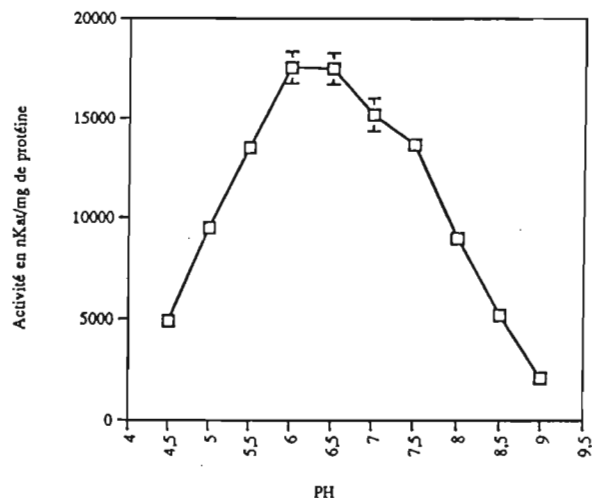


Figure 14: Effet du pH du milieu de dosage sur l'activité peroxydasique de l'extrait purifié (peroxydases anioniques)

Pour déterminer les effets du pH sur l'activité des peroxydases anioniques, les tampons suivants sont utilisés: acétate de sodium (0,1M) pour les pH compris entre 4,5 et 5,5; phosphate de potassium (0,1M) pour les pH compris entre 5,5 et 8 et tris-HCl (0,1M) pour les pH compris entre 8 et 9.

Les moyennes et écart-types sont effectuées sur 10 valeurs.

d'évaluation du degré de pureté des préparations de peroxydase fondée sur la valeur du rapport $R = DO_{405}/DO_{280}$; plus ce rapport est élevé, plus grande est la pureté de l'enzyme. Pour une peroxydase pure, le rapport R avoisine la valeur de 3 (Van Huystee, 1987). L'évolution, en cours de purification, de la valeur du rapport R est un excellent indicateur du taux "d'enrichissement" en cette enzyme (Tableau 2).

3 - Détermination des Poids Moléculaires

a - par électrophorèse en conditions semi-dénaturantes

Après électrophorèse, en condition semi-dénaturantes, d'un extrait purifié à partir de cotylédons de la variété Réba B50 prélevés 72h après inoculation par *Xcm* race 18, trois bandes d'activité sont mises en évidence. Ces bandes se situent à des niveaux de migration à des PM de 120 kDa, 60 kDa, et 45 kDa (Figure 13A). Lorsque la révélation est faite au bleu de Coomassie, trois bandes protéiques sont mises en évidence qui correspondent aux trois bandes d'activité peroxydasique révélées ci-dessus (Figure 13B). A noter que dix heures après inoculation, l'intensité de coloration de la bande 120kDa augmente parallèlement à celle des bandes P1 et P2.

b - par électrophorèse en conditions dénaturantes

Lorsque l'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), la coloration du gel au bleu de Coomassie révèle une bande majeure de PM égal à 60 kDa, et une bande très fine, correspondant à un PM de 45kDa (Figure 13C).

VIII- Détermination du pH optimal d'activité des peroxydases anioniques

Les peroxydases anioniques purifiées extraites des cotylédons de cotonnier résistants, 72h après inoculation par *Xcm* race 18, présentent (globalement, toutes isoformes confondues) une activité optimale à un pH compris entre 6 et 6,5 (Figure 14).

IX- Déglycosylation des peroxydases anioniques

La coloration au bleu de Coomassie révèle un faible déplacement de la protéine vers la zone de PM inférieur à 60kDa, indiquant que nos peroxydases ont bien été déglycosylées. On note également la disparition de la bande de masse égale à 120kDa (Figure 15A). Le nombre d'isoenzymes observées sur gel d'IEF reste de 5 après déglycosylation (Figure 15C), ce qui indique que la glycosylation des différentes isoformes n'est pas indispensable à leur activité catalytique.

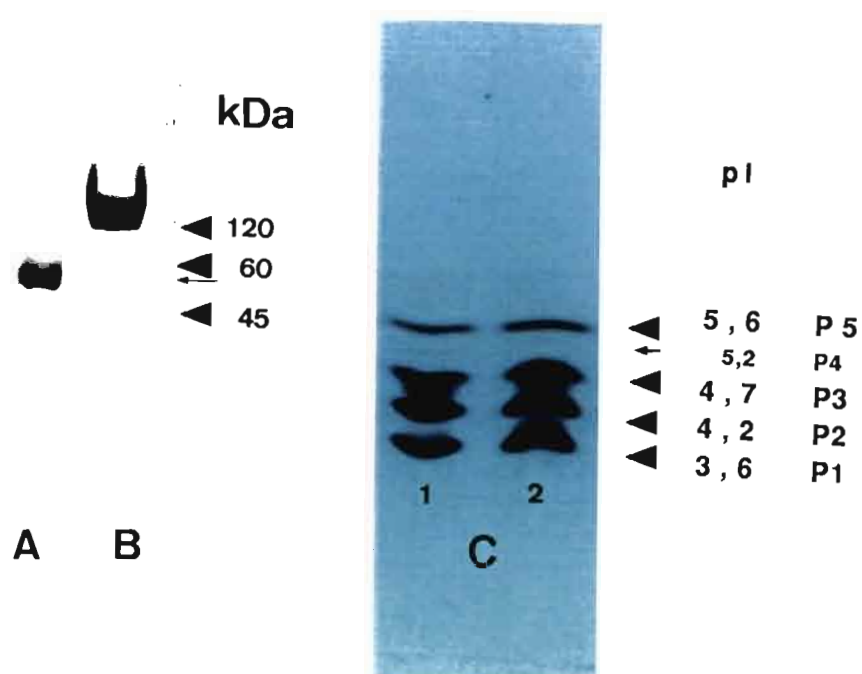


Figure 15: Déglycosylation des peroxydases anioniques

La déglycosylation enzymatique des peroxydases anioniques a été effectuée d'après le protocole du kit BIO-RAD (Enzymatic déglycosylation kit). On observe un abaissement de PM de la fraction de 60kDa, et la disparition de la bande 120kDa.

A-Extrait déglycosylé; **B**- Extrait avant déglycosylation; **C**-IEF réalisée sur les extraits (1) avant déglycosylation, (2) après déglycosylation.

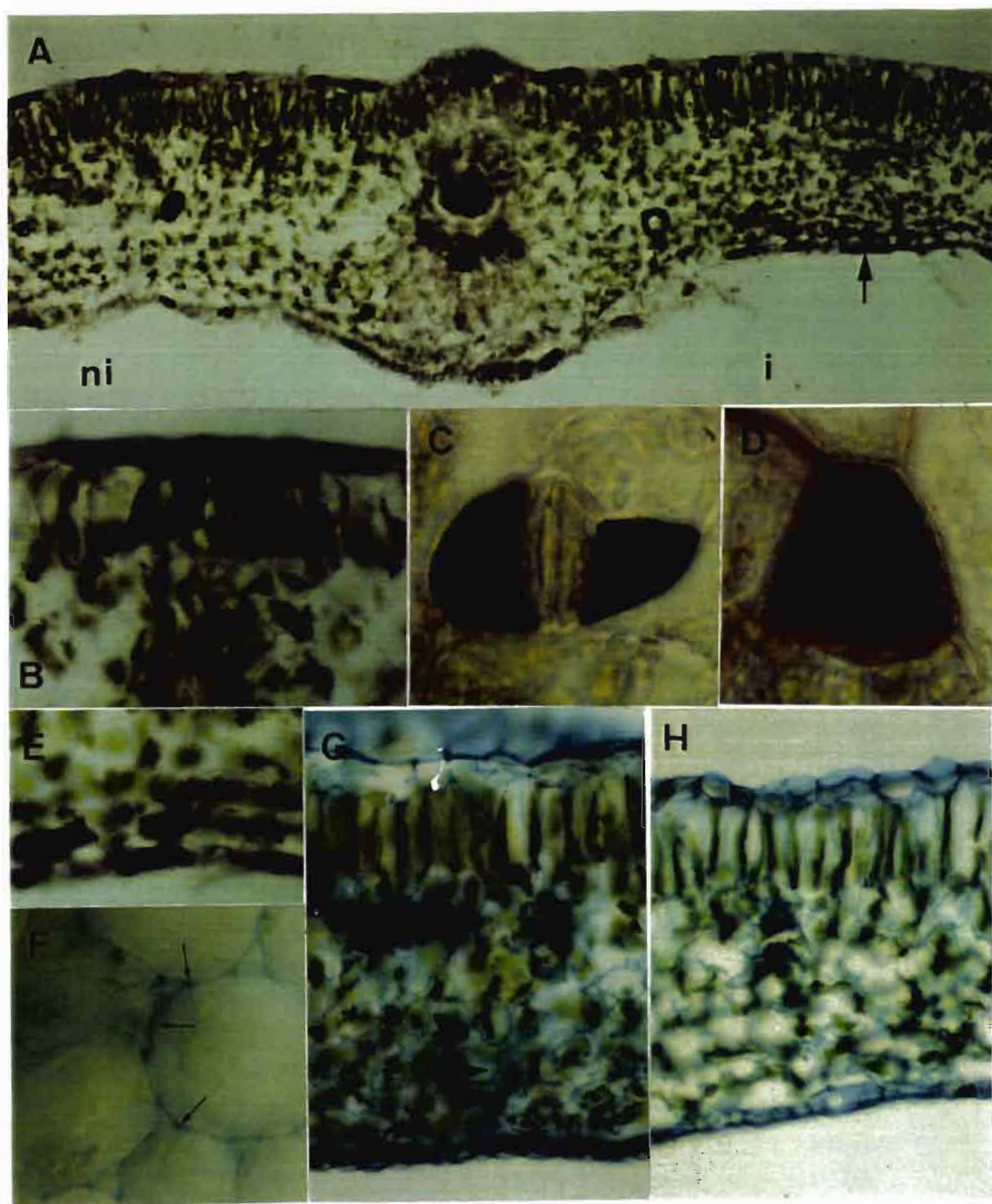


Figure 16 : localisation histochimique des activités peroxydases. A à E : activité guaiacol-peroxydase ; F à H : activité TMB-peroxydase.

A (**coupe transversale**): Quatre heures après l'infiltration du cotylédon de la variété résistante, une activité guaiacol-peroxydase est détectée dans les cellules du mésophylle lacuneux au niveau des sites d'infiltration (flèche) (i); à l'inverse, l'activité ne semble pas augmenter significativement dans la partie infiltrée avec de l'eau (ni) (x 700). B (**coupe transversale**), C (**vue tangentielle**): Cinq heures après l'infection, l'activité est également visible dans les cellules du mésophylle palissadique (B: x1100; C: x 1000). D (**vue tangentielle**) et E (**coupe transversale**): dans certaines cellules épidermiques une activité est détectable (D: x 1000; E: x 1000). F, G (**coupes transversales**): L'activité TMB-peroxydasique est localisée au niveau des parois cellulaires (flèches) et dans les espaces intercellulaires du mésophylle spongieux 6h après l'infection des cotylédons Réba B50 (F: x 1000; G: x 800). H (**coupe transversale**): l'activité mise en évidence dans les cotylédons de la variété Acala 44 est très inférieure à celle observée dans les plants résistants (H: x 800).

X- La localisation histochimique de l'activité peroxydasique

Quatre heures après l'infiltration de l'inoculum dans le cotylédon de la variété résistante, une activité guaiacol-peroxydase est détectée dans les cellules du mesophylle lacuneux au niveau des sites d'infiltration (Figure 16A, côté droit); à l'inverse, l'activité ne semble pas augmenter significativement dans la partie infiltrée avec de l'eau (Figure 16A, côté gauche). Cinq heures après l'infection, l'activité est également visible dans les cellules du mésophylle palissadique (Figure 16B), dans les cellules péristomatales (Figure 16C) ainsi que dans les cellules épidermiques (Figure 16D,E). L'activité TMB-peroxydasique est localisée au niveau des parois cellulaires (Figure 16F, G) et dans les espaces intercellulaires du mesophylle spongieux 6h après l'infection par *Xcm* race 18 des cotylédons Réba B50. Comparativement, l'activité mise en évidence dans les cotylédons de la variété Acala 44 lors de l'interaction compatible est très inférieure à celle observée dans les plants résistants (Figure 16H). Sans hydrogène peroxyde, aucune activité peroxydasique n'est détectée.

Les cinétiques d'activité peroxydasique par détection histochimique et cytochimique sont résumées dans le tableau 3.

XI- Localisation cytochimique de l'activité peroxydasique

Les résultats relatifs à la localisation ultrastructurale des activités peroxydasiques sont décrits dans le chapitre II. Succinctement, des composés très denses aux électrons sont localisés à partir de 3h dans l'apoplaste des cellules du parenchyme lacuneux, siège du déclenchement de RH.

XII- Expression des ARN messagers de peroxydase au cours de l'infestation du cotonnier par *Xcm*

Les ARN cellulaires totaux des cotylédons de cotonniers inoculés par *Xcm* ont été extraits à partir de deux séries d'expériences. Dans une première expérience, la souche de race 18 a été inoculée sur le cultivar de cotonnier Réba B50 uniquement, alors que dans une seconde expérience, la même souche a été inoculée sur les deux cultivars Acala et Réba.

Dans les deux cas, une cinétique d'expression des ARNm de peroxydase a été établie par prélèvement des cotylédons infestés aux temps 0, 2, 3, 4, 6, 12 et 24h après l'inoculation, extraction des ARN, dépôt sur membrane et hybridation avec

Tableau 3 : Détection histochimique et cytochimique de l'activité peroxydase dans les cotylédons inoculés avec *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* race 18

Cultivar	Temps (a)	réactifs					
		guaiacol (b)		TMB (b)		DAB (c)	
		lacuneux	palissadique	lacuneux	palissadique	lacuneux	palissadique
Resistant	0	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	++ (f)	± (g)
	4	+ (d)	-	-	-	++	+ (g)
	5	+	+ (d)	-	-		
	6	+	+	+ (e)	-	++ (d)	++ (g)
	9	+	+	++	-		
	15	+	+	++	-		
Sensible	0	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	±	-
	4	-	-	-	-	±	-
	5	-	-	-	-		
	6	-	-	-	-	±	±
	9	-	-	-	-		
	15	-	-	-	-		

- = activité non détectée; ± = faible activité; + = activité moyenne; ++ = activité forte.

a : heures après infection des cotylédons.

b : réactifs utilisés pour la détection histochimique.

c : réactif utilisé pour la détection cytochimique.

d : activité détectée dans les parois et le cytoplasme.

e : activité détectée dans les parois et les espaces intercellulaires.

f : activité détectée dans les parois et les cellules de gardes, le cytoplasme et les espaces intercellulaires des cellules du parenchyme lacuneux.

g : activité détectée dans les parois et le cytoplasme.

une sonde d'ADNc de peroxydase.

La figure 17 montre les résultats obtenus lors de la première expérience : deux dépôts d'ARN (1 μ g et 180ng) ont été effectués sur les membranes pour chacun des temps d'analyse, sauf pour le temps 0 où le taux d'ARN extrait était insuffisant. Pour les dépôts de 1 μ g d'ARN, on observe un signal intense d'hybridation de la sonde peroxydase pour tous les temps d'analyse, ce qui indique la présence d'ARNm de peroxydase dans les tissus cotylédonnaires du cultivar Reba à ces mêmes temps.

En revanche, pour les dépôts d'ARN de 180ng on observe une hybridation de la sonde peroxydase aux temps 3, 12 et 24h uniquement. Cette hybridation différentielle semble indiquer que, bien que les ARNm de peroxydase soient présents à tous les temps d'analyse, leur quantité respective varie à chacun des temps d'analyse. Ainsi, aux temps 1, 2, 4 et 6h, la quantité d'ARNm de peroxydase contenue dans les 160ng d'ARN totaux est insuffisante pour qu'un signal d'hybridation soit détecté, alors qu'elle est suffisante aux temps 3, 12 et 24h.

Dans une deuxième expérience, nous avons préparé des dot-blots en déposant 100ng des ARN extraits à partir de cotylédons des cultivars Reba B50 et Acala 44 inoculés par la souche de race 18. Pour le cultivar Réba B50, un signal d'hybridation de la sonde peroxydase n'a été obtenu que pour les temps 2, 3, 12 et 24h, ce qui rejoint les résultats obtenus dans la première expérience. Pour le cultivar Acala 44, aucun signal n'a été détecté, quel que soit le temps d'analyse

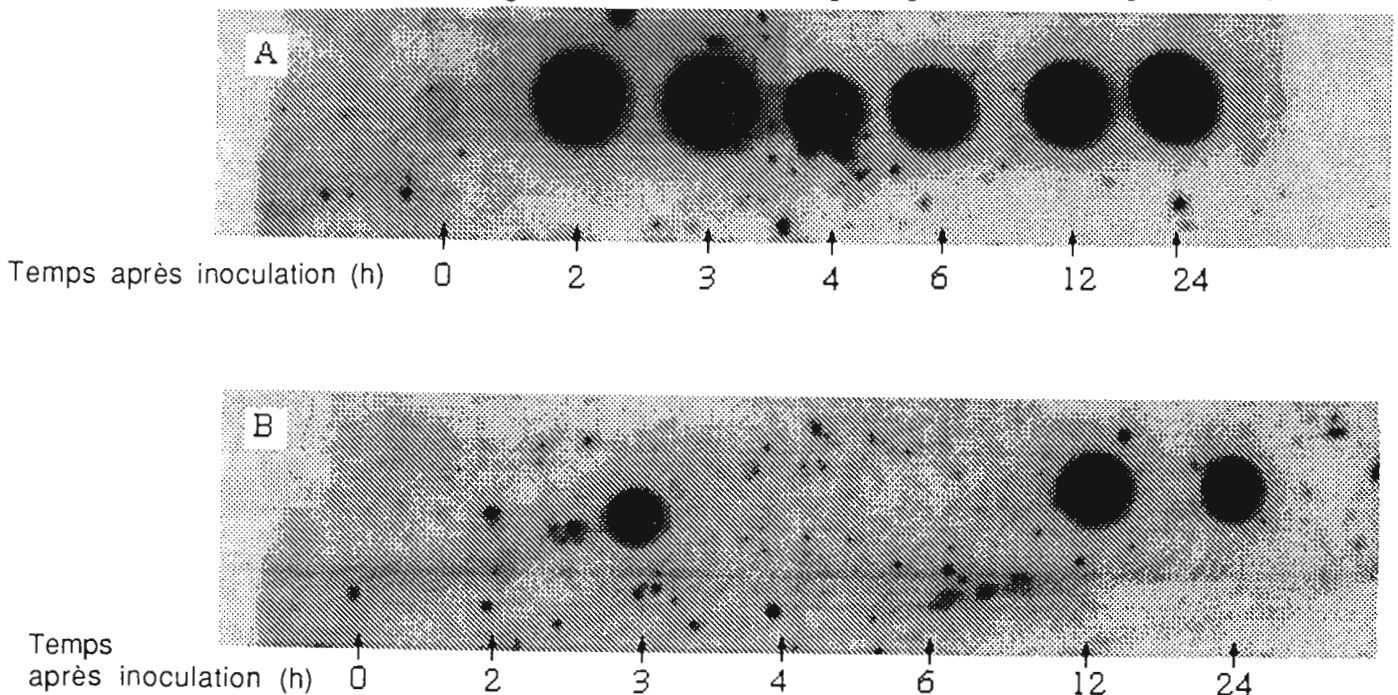


Figure 17 : Hybridation de la sonde ADNc de peroxydase sur l'ARN cellulaire total extrait des cotylédons de cotonnier (variété Réba B50) prélevés 0, 2, 3, 4, 6, 12 et 24h après inoculation avec la souche Xcm race 18.
Dépôts d'ARN total: 1 μ g (A); 180ng (B)

DISCUSSION

Chez le cotonnier, peu de travaux ont été effectués sur le rôle des peroxydases dans la résistance contre les micro-organismes. Mellon et Lee (1985) rapportent que l'inoculation de capsules de cotonnier par *A. flavus*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. semitectum* ou *R. solani* provoque une augmentation d'activité peroxydasique, associée à la stimulation de deux à cinq isoenzymes solubles non observées ou très peu actives chez les plants témoins, chaque champignon étant à l'origine d'un profil enzymatique différent. De même, l'infection des capsules de cotonnier par *Diplodia gossypina* provoque une augmentation de l'activité spécifique des peroxydases et une élévation de deux nouvelles formes enzymatiques par rapport aux contrôles (Wang et Pinckard, 1973). Sharma et al. (1984) rapportent une augmentation d'activité peroxydasique supérieure chez les plants sensibles de cotonnier par rapport aux cotonniers résistants inoculés par *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. Ils observent une à deux isoenzymes supplémentaires dans le cas de la réaction compatible, et établissent une corrélation entre le taux de mycélium fongique dans la plante et le niveau d'activité peroxydasique. Dans ce cas, cette "réaction" résulterait de l'élévation d'un mécanisme de défense et non de l'expression d'une résistance au sens génétique du terme. Onze heures après l'inoculation d'hypocotyles de plants de cotonnier avec *Rhizoctonia solani*, une augmentation d'activité peroxydasique a été observée dans les parois cellulaires, puis dans le cytoplasme, mais ne semble pas être liée à la résistance (Veech, 1976).

En réponse à *Xcm*, seul Venere (1980) rapporte une forte stimulation de l'activité peroxydasique dans le cotonnier résistant associée à une chute de la population bactérienne. Il suggère que les peroxydases oxydent la catéchine, un phénol majoritaire chez le cotonnier, en le transformant en un composé bactéricide.

Dans notre travail, sept bandes d'activité peroxydasiques sont détectées sur gel d'IEF dans les cotylédons de cotonnier des variétés Réba B50 et Acala 44 sains ou inoculés par *Xcm*. Parmi ces bandes, cinq (P1 à P5) se localisent dans la zone des points isoélectriques acides, alors que les deux autres ont migré dans la zone des points isoélectriques basiques (P6 et P7). Le comportement de ces isoformes est

analysé au cours de l'infection dans les systèmes compatible ou incompatible. L'isoforme P6 ne subit aucune variation d'activité apparente sur gel d'IEF après l'inoculation des deux variétés par *Xcm*. Nous proposons de ce fait de ne pas en tenir compte dans cette discussion.

I- Les peroxydases anioniques

Dans le cas de la réaction incompatible entre le cotonnier et *Xcm* race 18, une forte activité peroxydasique est mesurée spectrophotométriquement à partir de dix heures après l'infection. Parmi les cinq isoformes de pI acide, deux - P1 et P2 - se singularisent par une très forte augmentation de leur activité dans les extraits de plants de la variété résistante. Cette situation n'est observée ni chez les plantes sensibles inoculées, ni chez les plants témoins, sensibles ou résistants, infiltrés ou non par de l'eau. Enfin, aucune nouvelle isoperoxydase n'a été observée par rapport à celles détectées dans les plants contrôles.

Il est à noter qu'il existe une parfaite concordance dans le temps entre l'augmentation de l'activité peroxydasique globale mesurée au spectrophotomètre et celle correspondant aux bandes P1 et P2. De la même manière, dans le cas de l'interaction incompatible, la forte augmentation d'activité peroxydasique observée sur membrane de nitrocellulose après empreinte de tissus foliaires apparaît à partir de dix heures après l'inoculation, localisée aux sites d'infiltration de la bactérie, sites qui vont évoluer en lésion nécrotique. Etant donné que les deux systèmes compatibles - Acala 44/*Xcm* race 18 et Réba B50/*Xcm* race 20 - ne manifestent pas d'augmentation d'activité spécifique aux deux isoenzymes P1 et P2 et qu'à la forte élévation d'activité correspondant à ces deux bandes dans le cas de la réaction incompatible est associé un ralentissement de la multiplication bactérienne, il est légitime de suggérer que les deux bandes P1 et P2 sont liées à l'expression de la résistance du cotonnier contre *Xcm*.

Lors de l'infection de Réba B50 par *Xcm* race 20 (réaction compatible) on observe une augmentation intermédiaire d'activité totale comparée aux deux autres systèmes, incompatible: Réba B50/*Xcm* race 18 et compatible Acala 44/*Xcm* race 18 (tableau I). Cette augmentation d'activité ne résulte pas de la stimulation spécifique des deux isoformes P1 et P2 détectable sur IEF (Figure 5). Il est légitime de penser dans ce cas que le mécanisme de stimulation de l'activité peroxydasique lié aux cinq isoformes est différent de celui impliqué dans la

stimulation des isoformes P1 et P2. Etant donné que cette interaction entre Réba B50 et *Xcm* race 20 est de type compatible, cette augmentation d'activité peut être considérée comme un mécanisme d'activation de réactions de défense. Quoiqu'il en soit, malgré des réponses d'amplitudes variables au cours des 2 réactions compatibles, les symptômes de la bactériose apparaissent néanmoins simultanément chez les deux variétés. On pourrait alors penser que les peroxydases ne jouent pas un grand rôle dans les mécanismes de défense et/ou de résistance. Cependant, signalons à cet égard l'existence d'une corrélation inverse entre le niveau d'activité peroxydasique et le taux de multiplication bactérienne (Tableau 1). Ces résultats nous conduisent à poser deux hypothèses:

- soit le niveau d'activité peroxydasique dans le cas de l'interaction entre Réba B50 et *Xcm* race 20 n'est pas suffisant pour contribuer efficacement à l'expression de la résistance, suggérant l'existence d'un seuil d'efficacité;
- soit d'autres systèmes de défense déclenchés uniquement lors de la RH sont nécessaires pour agir conjointement avec l'expression des peroxydases.

Les différences observées, quant à elles, en terme de niveau d'activité peroxydasique au cours des deux interactions compatibles peuvent s'expliquer soit par la différence de l'équipement en peroxydase chez les deux variétés, soit en raison d'une "perception" différente de signaux impliqués dans le déclenchement des mécanismes de défense.

Dans le cas de l'interaction incompatible, une augmentation d'activité peroxydasique a également été observée dans les feuilles supérieures non inoculées. Elle est caractérisée par la stimulation, non pas des seules isoformes P1 et P2, mais, au contraire, des cinq peroxydases acides solubles, dont le profil enzymatique est similaire à celui des formes P1 à P5. Lorsque la variété Réba 50 est inoculée par *Xcm* race 20 (interaction compatible), non seulement le niveau de l'activité peroxydasique des cotylédons est plus faible [et aspécifique (augmentation des 5 isoformes acides)] que dans le cas d'une inoculation par *Xcm* race 18, mais l'augmentation de l'activité dans les feuilles est également plus réduite. Ces observations suggèrent que chez le cotonnier, l'augmentation de l'activité des peroxydases acides, suite à une infection par *Xcm*, dépend de deux mécanismes :

- l'un lié au déclenchement de la RH provoquant entre autre l'activation précoce de deux peroxydases spécifiques P1 et P2,
- et l'autre lié à l'activation des cinq peroxydases acides simultanément,

phénomène que l'on observe dans le cas d'une réaction compatible, ainsi que lors de l'induction systémique de l'activité.

A la lumière de ces observations conduites à la fois sur cotylédons et sur feuilles, il n'est pas établi que les cinq bandes d'activité peroxydasique observées sur gel d'IEF soient le produit de plusieurs gènes. Les isoenzymes apparentes peuvent résulter de modifications post-transcriptionnelles du produit d'un seul gène. En effet, la modification du produit d'un gène de peroxydase peut être à l'origine de différentes bandes d'activité sur gel, consécutive à des variations dans la fraction glycosyl des protéines, ou à des interactions avec des composés phénoliques (Van Huystee, 1987). Dans notre système, la déglycosylation et la purification effectuées sur les isoperoxydases acides ne nous ont cependant pas permis de réduire le nombre de bandes sur gel d'IEF. Seule une approche moléculaire portant sur l'étude des ARNm permettrait d'affiner notre étude.

Lors de la purification des peroxydases anioniques, il nous était impossible de séparer les différentes isoenzymes entre-elles par les méthodes conventionnelles. De plus, les bandes P1 et P2 partiellement isolées lors de différentes méthodes de séparation apparaissent accompagnées d'isoenzymes actives plus basiques, dont certaines correspondent aux pI des isoformes P3 et P4 existant préalablement dans ces mêmes tissus, et d'isoenzymes plus acides apparemment non constitutives de ces tissus. Borchert (1978) observait un phénomène similaire de déplacement de pI sur les isoperoxydases de tissus de pomme de terre séparées sur gel d'IEF. Il en déduit que des altérations *in vitro* des protéines peuvent affecter leur comportement électrophorétique, sans pour autant affecter le site actif. Dans le même sens, Darimont (1977) rapporte qu'un seul pic d'activité après passage sur une colonne d'IEF est révélé en plusieurs bandes d'activité après électrophorèse sur gel. Les précautions prises comme la conservation des peroxydases dans le glycérol, leur conservation à différentes températures (-80°C, -20°C ou +4°C), à différents pH, ou dans des solutions contenant des concentrations variables en calcium (pour stabiliser les peroxydases) se sont avérées inefficaces pour la résolution d'un tel problème.

Les peroxydases anioniques de cotonnier, étudiées dans ce chapitre, sont actives pour une gamme de pH assez large, suggérant qu'elles peuvent rester fonctionnelles dans des conditions environnementales variables. Dans notre cas, les peroxydases anioniques ne semblent pas être liées ioniquement à la paroi, puisque l'addition de NaCl et CaCl₂ dans le tampon d'extraction n'améliore pas

le rendement ni en terme d'activité enzymatique, ni en nombre d'isoenzymes. Les peroxydases anioniques du cotonnier identifiées dans nos expériences se classent donc parmi ce que l'on est convenu d'appeler des protéines solubles. En effet, les techniques de localisation histochimique de l'activité peroxydasique dans les cotylédons de cotonnier résistant ont révélé une localisation cytoplasmique des activités peroxydasiques dans les cellules de l'épiderme, dans les cellules mitoyennes des stomates, et dans les cellules du parenchyme du mésophylle, aux sites de pénétration et de multiplication des bactéries.

Avec les techniques histochimiques, les variations d'activité sont décelables dès quatre heures après l'infection, alors que par dosage au spectrophotomètre l'augmentation de l'activité n'est significative qu'à partir de dix heures après l'infection. Par cette méthode de dosage au spectrophotomètre, les faibles augmentations d'activité sont masquées par l'activité de base, alors que les techniques d'histologie permettent la visualisation de l'activité *in situ* sans broyage préalable des tissus et donc sans risque de dilution de faibles activités. Cette analyse met en exergue la plus grande acuité des techniques d'histochimie par rapport aux techniques de biochimie.

II- Détermination des poids moléculaires des peroxydases anioniques

Après purification des peroxydases acides, alors que cinq bandes d'activité sont détectées sur gel d'IEF, on n'observe, en condition semi-dénaturantes, que trois bandes respectivement de 120 kDa, 60 kDa et 45 kDa. Dix heures après l'inoculation, l'activité de la bande majeure (120 kDa) augmente parallèlement à l'activité des 2 bandes P1 et P2 sur IEF. Ces résultats suggèrent que les deux bandes d'activité détectées sur IEF correspondant à P1 et P2 élicitées lors de l'infection par *Xcm* migrent au niveau du même PM (120 kDa) en conditions semi-dénaturantes; P1 et P2 seraient donc deux isoformes de même PM.

Paradoxalement, en conditions strictement dénaturantes, seules deux bandes de 60 kDa et 45kDa sont visibles. Non seulement P1 et P2 auraient le même PM, mais de plus pourraient être des dimères, à moins que la dimérisation ne soit un artefact expérimental. Van Huystee, (1987) rapporte, en effet que les peroxydases natives peuvent former des polymères ou d'autres complexes sur gel d'électrophorèse. Des anomalies électrophorétiques similaires ont également été rapportées par Flurkey (1990) pour des polyphénoloxydases purifiées sur haricots, et Tripplett et Mellon (1992) attribuent de telles anomalies électrophorétiques à la

partie carbohydate de la glycoprotéine native qui pourrait modifier l'association de la protéine avec le SDS en l'absence de dénaturation par la chaleur. Dans notre étude, en effet, après déglycosylation, seules persistent les bandes de PM 60 ou 45 kDa sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes. Nos résultats suggèrent que les cinq peroxydases acides peuvent avoir un PM de 60 ou 45 kDa. Seules la séparation des isoformes entre elles pourrait permettre de déterminer leur PM effectif. Néanmoins, le fait que lors de la réaction RH, seule l'activité des P1 et P2 soient élicitées et qu'elles aient le même PM suggère qu'elles pourraient être le produit d'un même gène et que la distinction entre les deux isoformes serait liée à une simple modification physicochimique (équilibre entre deux conformations ?); en tout état de cause elles sont sous le contrôle d'un même système de régulation. Les autres isoformes (P3 à P5) pourraient correspondre à la bande de 45 kDa.

III- Les peroxydases cationiques

La localisation ultrastructurale de l'activité peroxydasique par microscopie électronique à transmission a révélé sa présence dans les parois primaires et les lamelles moyennes des cellules du parenchyme lacuneux trois heures après l'infection des cotylédons de la variété résistante. Au même temps et pour la même variété, la technique d'IEF montre une augmentation d'activité importante d'une isoperoxydase cationique de pI 9,45 (P7). Sa révélation, dans les mêmes conditions expérimentales, exige toutefois un temps d'incubation relativement long dans le substrat guaiacol/H₂O₂ pour une activité nettement inférieure à celle des peroxydases anioniques. Ceci pourrait s'expliquer par une affinité plus faible de l'isoforme P7 pour le guaiacol, ou par un pH optimum d'activité différent de celui des peroxydases anioniques. La stimulation ponctuelle de l'activité de la P7, très localisée dans le temps et uniquement chez la variété résistante, suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans les premières étapes de la résistance du cotonnier à *Xcm*.

IV- Synthèse *de novo*?

La cinétique d'expression des ARNm effectuée sur les cotylédons infectés des deux variétés a révélé une augmentation d'ARNm de peroxydase deux et trois heures, puis douze et vingt-quatre heures après inoculation. On observe une concordance dans le temps entre les augmentations d'activité peroxydasique

détectées et celles de la quantité d'ARNm. Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent dans un premier temps que les peroxydases du cotonnier - aussi bien les isoformes cationiques, dont une augmentation d'activité a été détectée trois heures après l'inoculation, que les isoformes anioniques dont l'activité augmente à partir de dix heures après l'infection - sont régulées de façon transcriptionnelle. A noter que si tel est le cas, l'augmentation de la quantité d'ARNm des peroxydases anioniques commence très certainement avant dix heures post-inoculation, mais les faibles quantités d'ARNm ne semblent pas être détectées dans notre expérience.

D'après nos résultats, l'augmentation d'ARNm détectée trois heures post-inoculation correspondrait à une transcription de l'isoperoxydase P7, et les ARN détectés douze heures et vingt-quatre heures après l'inoculation correspondrait à une transcription des isoperoxydases P1 et P2. Les différents gènes de peroxydases peuvent être régulés de façon distincte au cours de l'interaction avec un agent pathogène (Harrison et al., 1995; Curtis et al., 1997). Chitoor et al., (1997) observent une expression différentielle de deux gènes de peroxydase lors d'une interaction incompatible entre le riz et *X. oryzae* pv. *oryzae*; ils démontrent que les différents gènes de peroxydase peuvent être régulés de façon distincte. Une analyse plus approfondie sur les gènes des peroxydases du cotonnier devraient être effectuée afin de déterminer le nombre de ces gènes et leur mode de régulation.

Cependant, malgré des quantités en ARNm de peroxydase qui semblent évoluer parallèlement aux variations d'activité peroxydasique, aucun autre argument ne permet de confirmer l'existence d'un lien entre ces deux événements. En effet, une augmentation d'ARNm ne correspond pas toujours à une augmentation de la traduction en protéines. On peut visualiser une augmentation de la quantité d'ARNm traduisant une diminution du "turn over" des ARNm, qui s'accumulent alors transitoirement, pour être traductibles ultérieurement. Ces observations confirment l'intérêt d'approfondir l'aspect moléculaire de ces recherches.

L'objet de ce chapitre était de caractériser par plusieurs techniques les variations d'activité peroxydasique dans les cotylédons et les feuilles respectivement de variétés de cotonnier résistantes et sensibles à *Xcm*. Les approches biochimiques et cytologiques conduites pour atteindre (partiellement) cet objectif ont révélé des augmentations significatives d'activité étroitement

associées aux plantes résistantes. Dans les prochains chapitres on se propose d'étudier le rôle potentiel de ces peroxydases durant l'infection.

Etant donné que l'on observe une augmentation d'activité des peroxydases cationiques dans les premières heures suivant l'infection, on s'intéressera, dans le chapitre II à leur implication dans les premières étapes de la formation de la RH.

Le chapitre III sera dédié à l'étude du rôle des peroxydases anioniques du cotonnier en réponse à l'infection par *Xcm* ainsi qu'à l'implication de l'acide salicylique (AS) dans l'activation (ou l'induction?) de ces peroxydases dans la SAR.

CHAPITRE 2

Rôles des peroxydases dans la réaction hypersensible.

Mise en évidence de leur implication dans la
génération de formes réactives de l'oxygène

Abstract

The bacterium *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* is the causal agent of cotton leaf blight. An hypersensitive reaction (HR) is differentiated in the resistant variety Reba B50 after infiltration of cotyledons with the avirulent race 18. Active oxygen species (AOS) generated during the oxidative burst are believed to be closely associated with the HR. In this work, the production of AOS was studied using biochemical and cytochemical techniques. Superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) was detected in cotyledon discs by the cytochrome c reduction activity three hours after infection. This activity was inhibited by SOD and by the peroxidase inhibitors, SHAM and KCN, but not by the NADPH oxidase inhibitor DPI. Correlatively, a strong NADH oxidation activity that was assessed three hours after bacterial infection in crude extracts or in the apoplastic washing fluid, dramatically decreased after treatment with SHAM or KCN, and was activated by 2,4 dichlorophenol and $MnCl_2$. The increase in the activity of a cationic peroxidase (pI 9.5) was detected by isoelectrofocusing three hours after infection of resistant cotyledons. Activities of apoplastic peroxidase(s) and H_2O_2 accumulation was also evidenced cytochemically, three and four hours post infection, respectively. When digitonin, a superoxide anion elicitor, was infiltrated within cotyledons from the resistant Reba B50 and the susceptible varieties Acala 44, generation of $O_2^{\cdot-}$ radicals was shown to be importantly reduced by SOD and inhibited both by SHAM, KCN, or DPI. These results strongly suggest that cotton cotyledons contain two superoxide anion-generating enzymes. But challenged cells that undergo the HR to an avirulent race of *X. c.* pv. *malvacearum*, produce $O_2^{\cdot-}$ mediated by an apoplastic peroxidase, despite the presence of a NADPH oxidase.

INTRODUCTION

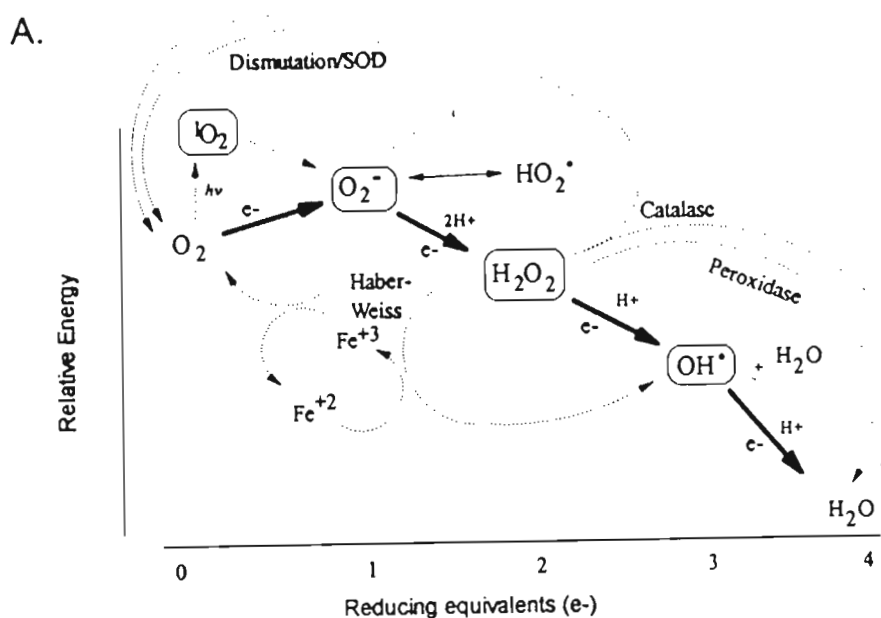
Il a été démontré que les plantes pouvaient produire des formes réactives de l'oxygène lors des interactions avec des agents pathogènes (Doke, 1983a, b; Sutherland, 1991). Un grand nombre de travaux rapportent de fortes analogies entre la production de formes réactives de l'oxygène chez les plantes, et le burst oxydatif des phagocytes chez les mammifères (Adam et al., 1989; Anderson, 1989). Lors de la résistance de végétaux contre des microorganismes, la production d'oxygène actif est impliquée dans un double rôle, celui d'avoir une action toxique à la fois à l'égard de l'agent pathogène et des cellules végétales. Le terme "forme réactive de l'oxygène" fait référence à des molécules résultant de la réduction de la molécule d'oxygène (O_2). Dans le schéma ci-dessous sont décrites les interactions primaires entre les différentes espèces de l'oxygène, qui ont un intérêt dans les interactions plante-parasite (Baker et Orlandy, 1995).

La première réduction aboutit à l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cette étape, nécessitant peu d'énergie, est très souvent assurée par des enzymes comme la NADPH-oxydase. Les trois réductions suivantes conduisent à la formation de l'hydrogène peroxyde (H_2O_2), du radical hydroxyl ($OH\cdot$) et, finalement de l'eau. Ces réductions ont lieu spontanément (à des pH acides ou neutres), ou en présence d'enzymes adéquates (SOD, catalase, peroxydase). Dans les plantes, l'anion superoxyde existe en équilibre avec son acide conjugué, le radical hydroperoxyde ($HO_2\cdot$), composé plus réactif pour initier la peroxydation des lipides pouvant être à la base de la nécrose cellulaire lors de la RH. Le radical hydroxyl ($OH\cdot$) est formé via la réaction Haber-Weiss, et possède une demie-vie de l'ordre de la microseconde, et réagit ainsi avec les composés proches de son site de génération.

Parmi les enzymes responsables de cette production d'oxygène actif chez les

plantes en réponse à un agent pathogène, une NADPH-oxydase (supposée plasmalemmique) a été identifiée chez de nombreux végétaux (Baker et Orlandy, 1995; Bolwell et al., 1995) comme étant responsable de la production d'anion superoxyde lors de la résistance. D'autres sources de production de forme réactives de l'oxygène en réponse à l'agression d'organisme phytopathogène ont été identifiées comme étant des oxalate-oxydase chez les céréales (Zhang et al., 1995), ou encore des peroxydase (Askerlund et al., 1987; Baker et Orlandy, 1995) productrices d'hydrogène peroxyde.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au burst oxydatif du cotonnier lors de l'interaction avec *Xcm*. Cette étude consiste à mettre en évidence l'implication des enzymes productrices de formes réactives de l'oxygène lors de l'interaction incompatible.



B.

Superoxide/hydroperoxyl Equil.: $O_2^- + H^+ \longleftrightarrow HO_2^\bullet$ (pKa = 4.8)

Dismutation: $HO_2^\bullet + O_2^- + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ ($k_2 \approx 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ ($k_2 \approx 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

Haber - Weiss Reaction: $Fe^{3+} + O_2^- \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$
 $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^\bullet + OH^-$

Summary: $O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow OH^\bullet + OH^- + O_2$

Peroxidase: Peroxidase + $H_2O_2 \longrightarrow$ Compound I + H_2O
 Compound I + $RH_2 \longrightarrow$ Compound II + RH^\bullet
 Compound II + $RH_2 \longrightarrow$ Peroxidase + $RH^\bullet + H_2O$

Catalase: $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

Among the early events that take place during plant-pathogen interactions, an oxidative burst consisting in a localized, rapid and transient production of active oxygen species (AOS) (Baker and Orlandy, 1995; Bolwell et al., 1995; Tzeng and de Vay, 1993) has received considerable attention for its role in plant resistance (Sutherland, 1991; Medhy, 1994). It has been postulated that highly reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) could initiate lipid peroxidation of the plasmalemma and would promote the hypersensitive response (HR) (Adam et al., 1989; Naton et al., 1996). The ensuing disruption of the membrane was proposed to have two major effects (1) the increase of cell leakiness that constitutes the first distinctive sign of the HR, and (2) the release of signal molecules into the plant cell (Low and Merida, 1996) leading to activation of defense genes (Degousee et al., 1994; Devlin and Gustine, 1992). The oxidative burst may also function as a first line of defense in resistant plants by directly attacking the pathogen during the earliest stages of infection (Low and Merida, 1996; Baker and Orlandy, 1995).

Among responses promoted by AOS, cross-linking of cell wall proteins and phenols was demonstrated to be associated with the plant defense (Tenhaken et al., 1995). Hydrogen peroxide was also required for lignification (Eltner and Heupel, 1976), since H_2O_2 biosynthesis has been localized in plant tissues to sites of lignin deposition (Olson and Varmer, 1996). Presumably, the oxidative burst was designed to be lethal to cells directly injured by pathogen interaction. However, adjacent plant cells that must survive and mount a defense response will also need to avoid collateral damage from the proximately released $H_2O_2/O_2^{\cdot-}$. In this respect, low level of H_2O_2 has been shown to stimulate transcription of genes encoding proteins that protect against oxidant stress the proximal cells of the HR (Levine et al., 1994).

Studies on enzymatic mechanisms of the oxidative burst in plants mainly focused on the neutrophil NADPH oxidase complex (Desikan et al., 1996), also known as the primary source of AOS production in mammals (Groom et al., 1996). The function of the oxidative burst in human neutrophils is clearly microbicidal (Rossi, 1986), as evidenced by the enhanced susceptibility to infectious disease in individuals with a compromised oxidative response. Some of the compounds found to elicit the oxidative burst in animal cells also trigger AO production in plant cells (Legendre et al., 1992; Mittler and Lam, 1996). In addition, the signalling pathway elucidated for AO production has closely paralleled that established for the animal respiratory burst enzyme (Tenhaken et al., 1995). More evidence for the presence of an NADPH respiratory burst oxidase in plants may be forthcoming: antibodies raised against components of the human neutrophil respiratory burst oxidase have recently been demonstrated to cross-react with proteins of the same molecular weight from several plant cell lines (Baker and Orlandy, 1995; Bolwell et al., 1995). Peroxidases have been suggested to act as NAD(P)H oxidases leading to the formation of AOS during plant pathogen interactions (Adam et al., 1989; Bolwell et al., 1995; Peng and Kuc, 1992). Nevertheless, these peroxidases have received much less attention than the usual role they have in peroxidative activity and detoxification. Although many potential sources of AOS in plant cells were identified, it is still unclear which mechanisms predominate during plant-pathogen interactions (Adam et al., 1995).

Infiltration of avirulent races from the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* (*Xcm*) within the apoplasm of cotyledons from resistant varieties of cotton (*Gossypium hirsutum*) induced a HR (Hillocks, 1992). The resistant variety Reba B50 contains the resistance gene combination B2-B3 involved in gene-for-gene interactions with *Xcm* avirulent race 18 (De Feyter et al., 1992). Responses mediated by resistance genes are characterized by

hypersensitive cell death of mesophyll infected areas one day post inoculation; the pathogen is restricted within these necrotic lesions. Cotton cells undergoing HR cell death displayed condensed cytoplasm with numerous vesicles, and localized cell wall degradation (Daï et al., 1996). In the opposite, the race 18 is virulent for the susceptible variety Acala 44, and spread beyond infection sites until leaf blight. Research about the nature of cotton resistance to bacterial blight has been mainly focused on sesquiterpenoid phytoalexins, the major antimicrobial molecules produced by cotton plants (Essenberg and Pierce, 1994; Gorski et al., 1995). Flavonoids were also histochemically evidenced at sites where the HR developed, accumulating in callose-rich papillae and host cell walls (Daï et al., 1996). In a recent study, we showed that the activity of several peroxidases was locally stimulated at HR sites of resistant cotyledons and systemically induced in the whole resistant plants (Martinez et al., 1996), but roles of these triggered peroxidases were not yet elucidated.

In the present paper, we have been interested in the oxidative burst in the incompatible interaction of cotton cotyledons with the *Xcm* avirulent race 18. Evidence is presented that both the resistant Reba B50 and susceptible Acala 44 varieties contain two AOS-producing systems in cotyledons : a NAD(P)H oxidase, and an apoplastic NADH-dependent peroxidase. Experiments reveal that the peroxidase only generates $O_2^{\cdot-}$ during the oxidative burst associated with the differentiation of the HR.

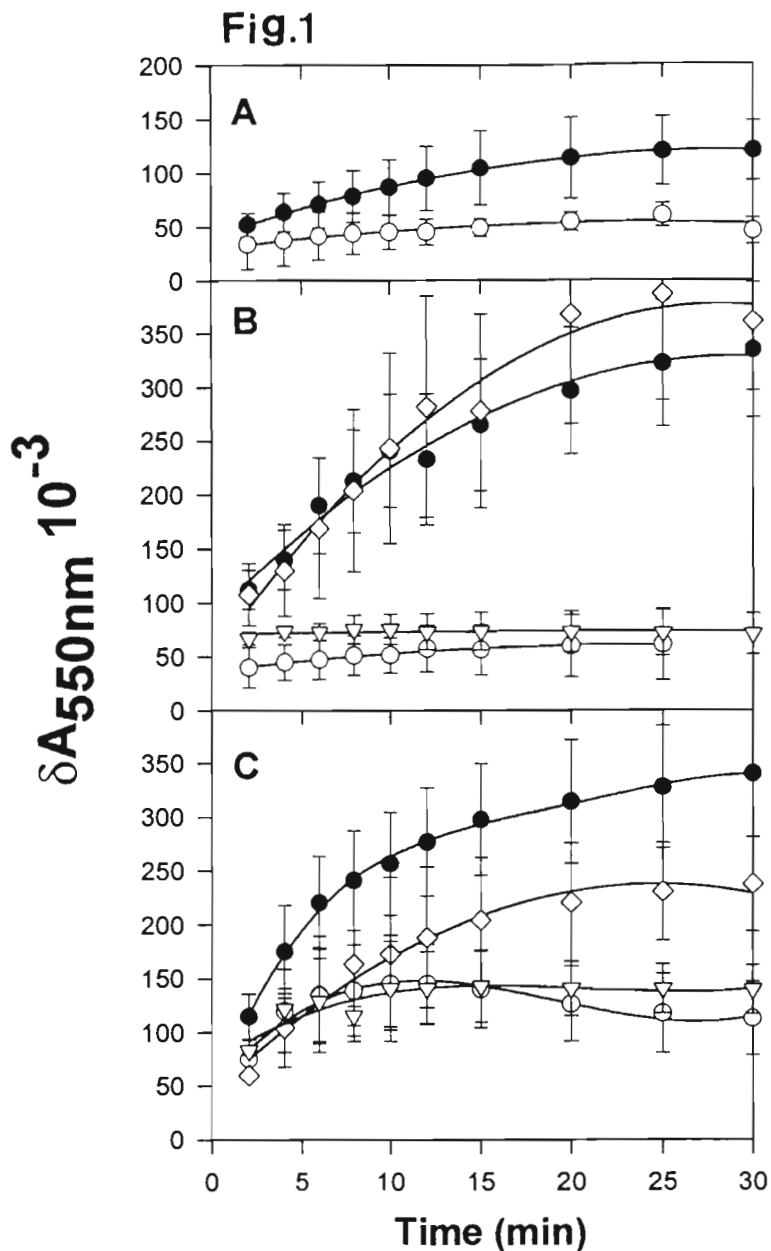


Figure 1 : Time course of extracellular cytochrome c reducing activity of f Reba B50 3 h after infiltration with water (A, ●), with Xam race 18 (B, ●) or r immediately after infiltration with 80 μ M digitonin (C, ●). Absorbance at t 550 nm of samples were read against a reference cuvette containing 20 μ M I cytochrome c + 100 μ M DFO in PBS. Reducing activities were monitored in t presence of 1000 U/ml of SOD (○) or 20 μ M DPI (◇) or 50 μ M KCN (Δ). Values are means \pm SD of 3 separate experiments with 5 replicates each.

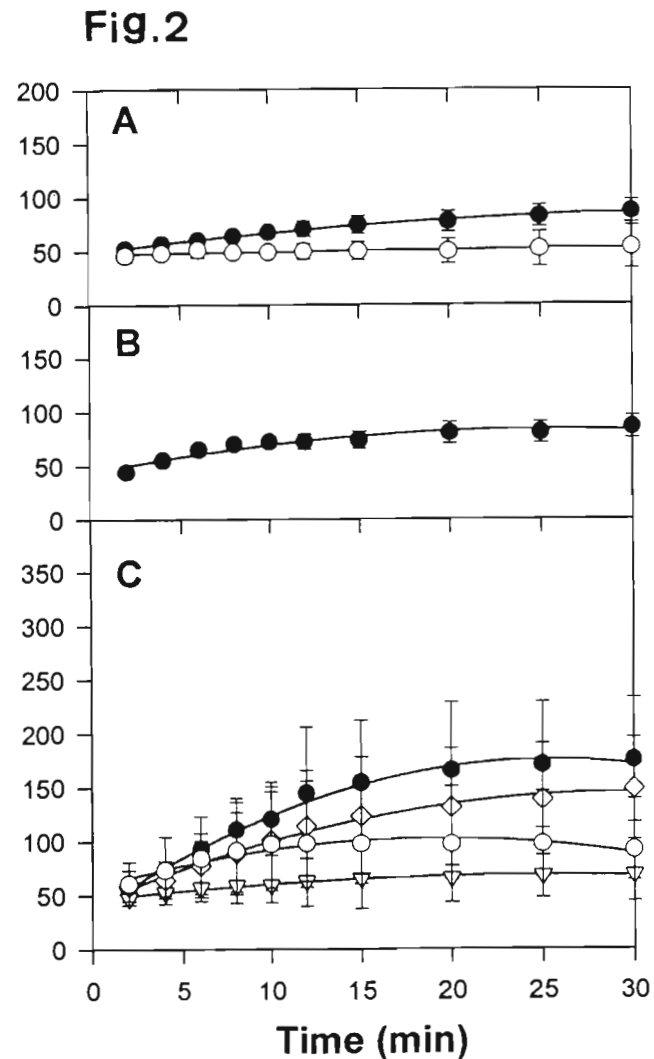


Figure 2 : Time course of extracellular cytochrome c reducing activity of Acala 44. Inoculations, treatments and number of replicates were identical as those in figure 1.

Results

I- In vivo characterization of the oxidative bursts in cotton varieties Reba B50 and Acala 44.

Cytochrome c reducing activities were estimated on cotyledon discs of the two varieties Reba B50 (Figure 1) and Acala 44 (Figure 2), resistant and susceptible to *Xcm* race 18 respectively, either 3h after water- (A) or *Xcm* inoculation (B), or immediately after infiltration with 80 μ M digitonin (C) .

Controls, infiltrated with water or with ethanol (0.5% in water), showed slight extracellular reducing activities (Figures 1A and 2A) which were similar at 3 h to those estimated immediately after water treatment (data not shown). Intensities of the reducing activity (estimated by the initial slopes of the curves) differed between the two varieties since activities in Reba B50 controls were 2-fold higher than in Acala 44 ones. These activities were 80 to 90% inhibited by the addition of SOD (1000 U/ml) in the reaction medium (Figures 1A and 2A), indicating that superoxide anion was the main component involved in the extracellular reduction of cytochrome c.

Three hours after infiltration of cotyledons from Acala 44 (Figure 2B) or Reba B50 (not shown) with race 18 and race 20, respectively, the reducing activity remained similar to controls, whereas it was enhanced in race 18-infiltrated Reba B50 (300% of controls) (Figure 1B). This activity was 90% inhibited by the addition of SOD, totally blocked by KCN (50 μ M), and was not sensitive to DPI (20 μ M) (Figure 1B). Higher concentrations of DPI (up to 100 μ M) yielded similar results (data not shown).

Infiltration of cotyledons of both varieties with 80 μ M digitonin immediately stimulated the reducing activities (Figures 1C and 2C) that was about 3-fold higher in Reba B50 than in Acala 44. Eighty percents of the Reba B50 activity was inhibited by SOD whereas that of Acala 44 was only 50 % inhibited.

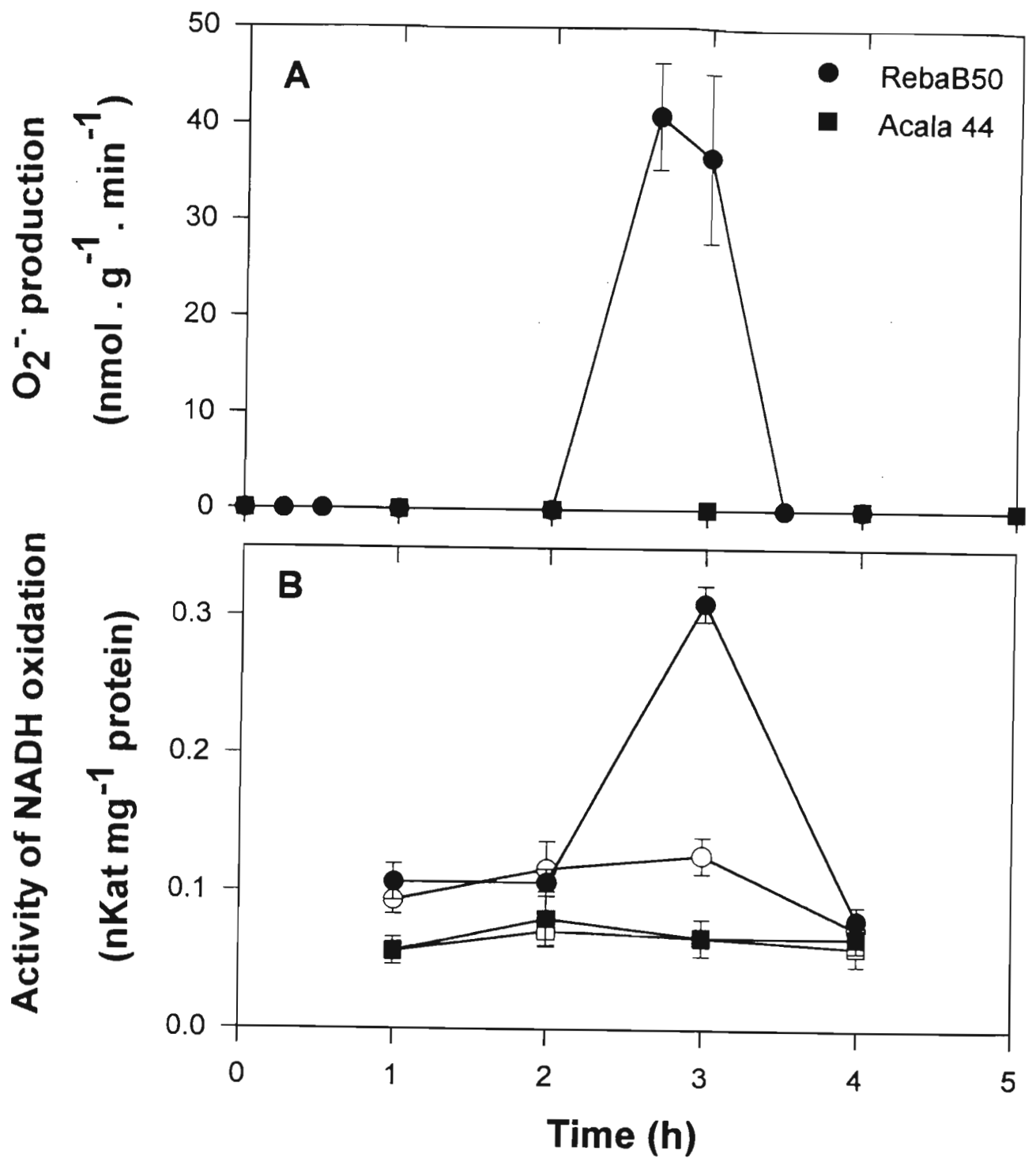


Figure 3 : Time course changes in O₂^{·-} production (A) and in activity of NADH oxidation of crude enzymatic extracts (B) of Reba B50 (●, ○) and Acala 44 (■, □) inoculated with Xam, race 18. O₂^{·-} production values of inoculated plants were subtracted from the corresponding water infiltrated controls. Open symbols (B) correspond to NADH oxidation activity of water controls. Values are means ± SD of 2 separate experiments with 5 replicates each.

The digitonin-induced cytochrome c reducing activity of both varieties Reba B50 and Acala 44 were sensitive to DPI after treatment with digitonin (53 and 38 % inhibition, respectively) and KCN (60 % and 80 % inhibition, respectively).

II-Time course changes in AOS production and NADH oxidation activity during cotton/*Xcm* interactions.

The superoxide anion production rates were estimated from the respective cytochrome c reducing activities, taking into account the inhibition with SOD. As shown in Figure 3A, the incompatible interaction (Reba B50/*Xcm* race 18) was characterized by a sharp peak of $O_2^{\cdot-}$ production occurring between 2.5h and 3h after infection. At that time, production of $O_2^{\cdot-}$ was about $40 \text{ nmoles p g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. In the compatible interactions {Acala 44/*Xcm* race18, (Figure 3A) and Reba B50/*Xcm* race20, data not shown}, a low basal production (not significantly different from controls) was observed over a 5h period .

NADH oxidation activity of crude cotyledon extracts was measured over 4h following inoculation of Reba B50 and Acala 44 with *Xcm* race 18, (Figure 3B). Constitutive activities, estimated in extracts from control samples, averaged $0.1 \pm 0.017 \text{ nKat mg}^{-1} \text{ protein}$ for Reba B50 and $0.07 \pm 0.007 \text{ nKat mg}^{-1} \text{ protein}$ for Acala 44. Whereas NADH oxidation activities remained unchanged during the compatible challenges, including that with *Xcm* race 20 (data not shown), the incompatible situation was characterized by a 3-fold increase in specific activity, 3h after inoculation ($0.31 \pm 0.013 \text{ nKat mg}^{-1} \text{ protein}$) which dropped to the basal level 4h after infiltration. No increase in the specific activity was observed in extracts of Reba B50 inoculated with heat-killed bacteria ($0.1 \pm 0.01 \text{ nKat mg}^{-1} \text{ protein}$).

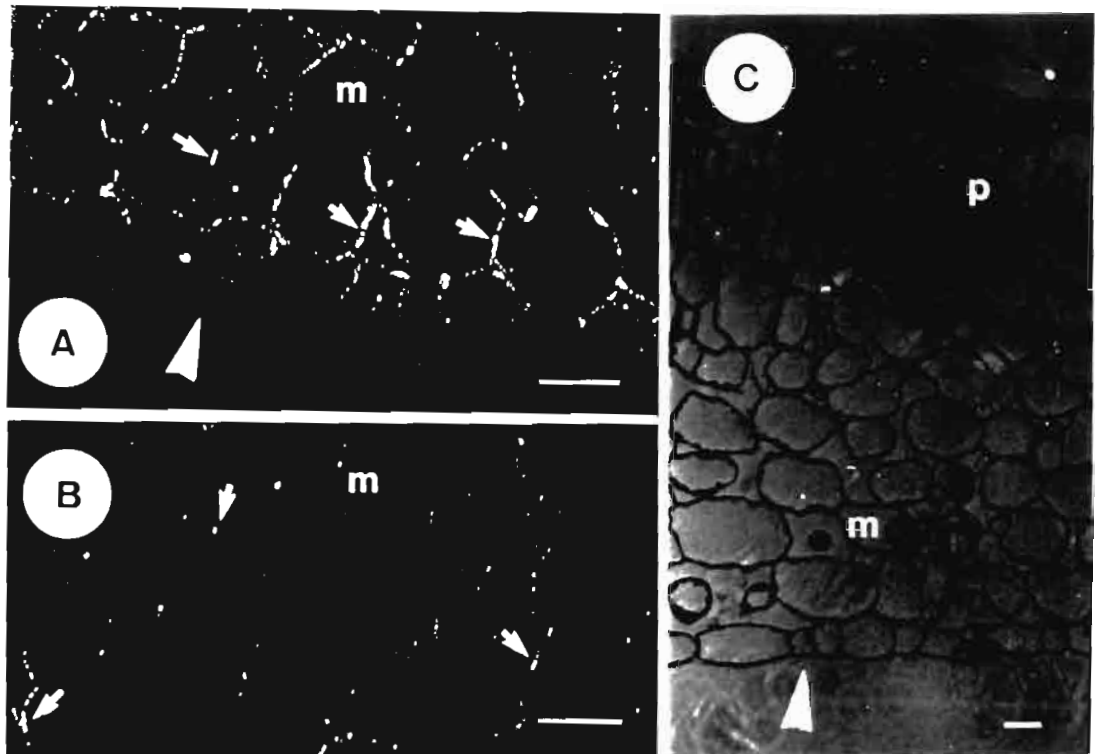


Figure 4 : Epipolarized fluorescence micrographs of the localization of H_2O_2 .

A. Four hours after infiltration of cotyledons of resistant plants Reba B50 with the pathogen, intense fluorescence of walls (small arrows) is mainly observed in the spongy mesophyll (m) where the pathogen was inoculated (large arrow) (Bar = 3 μ m).

B. After injection of water in resistant cotyledons, few cerium perhydroxide precipitates was seen in mesophyll (m) cell walls (arrows) (Bar = 3 μ m).

C. Inoculation of the susceptible cultivar with the inoculum or with distilled water did not yield any significant fluorescent (p : palisade mesophyll; arrow : site of injection at the lower epidermis) (Bar = 1.5 μ m).

H₂O₂ was histochemically detected using cerium chloride. Ce³⁺ was added to trap H₂O₂ as insoluble cerium perhydroxide that appeared fluorescent after illumination of sections from the treated fragments with epipolarized ultraviolet light. Two hours after bacterial infiltration, no significant deposits of refractive particles were seen in the inoculated tissues, while 4 to 6h after inoculation, they were seen accumulated on walls and in intercellular spaces of cotyledon cells from the resistant cultivar (Figure 4A) as compared to that observed in water-infiltrated cotyledons (Figure 4B). Intense fluorescence of walls was mainly observed in the spongy mesophyll where the pathogen was inoculated but weakly in palisade cells (data not shown). Inoculation of the susceptible cultivar with *Xcm*, race 18 or infiltration with water did not yield any significant fluorescence (Figure 4C).

Similar results were obtained whether AT was added or not to the inoculum (not shown) suggesting catalase was absent from the observed tissues or that modifications caused by catalase were too weak to be detected by this microscopical method.

III- Characterization of the NADH oxidation activity.

As shown in Figure 5, the activity of extracts obtained 3h after inoculation of Reba B50 with *Xcm* race 18 was 75 % inhibited when KCN (50μM) or SHAM (5mM) was added to the reaction mixture. In controls, the activity of extracts was only 42% inhibited, while no significant inhibition in such activity was observed with Acala 44 extracts. In addition, boiled extracts from both varieties did not display any detectable activity (not shown). Addition of MnCl₂ (2mM) or 2,4-DCP (17μM), known to induce peroxidase activity, strongly enhanced the specific activities of extracts obtained from both cotton varieties. Activities in extracts from water-infiltrated or *Xcm* race 18-infected Reba B50 plants were similar when

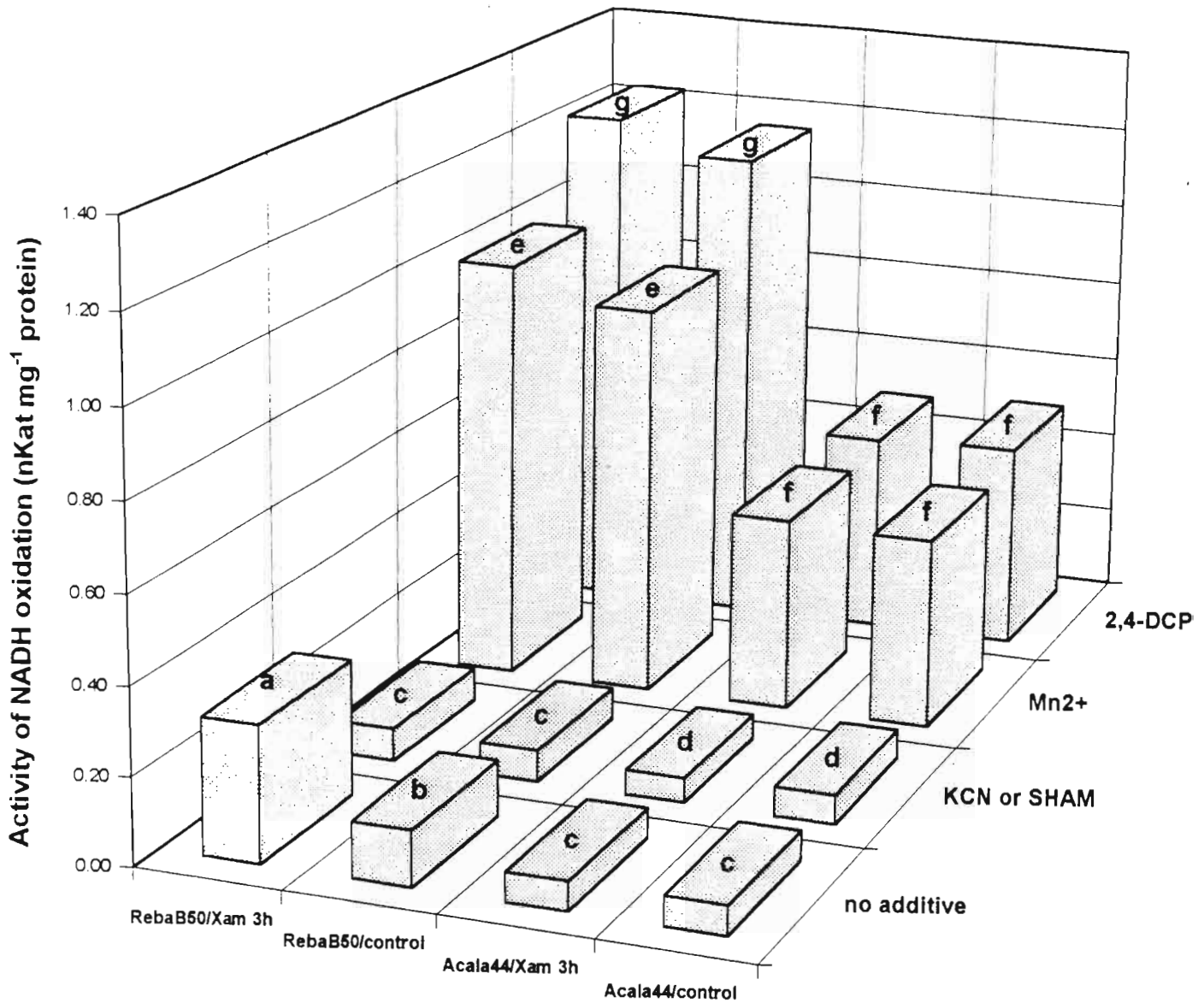


Figure 5 : Effect of KCN 50 μ M, SHAM 5 mM, MnCl₂ 2 mM and 2,4-DCP 17 μ M on specific NADH oxidation activity. Crude enzymatic extracts from RebaB50 and Acala44 were prepared 3h post-inoculation or infiltration with water, according to the method described in the "experimental procedures" section. Compounds were added to the reaction buffer just before addition of enzymatic extracts. Values are means of 2 separate experiments with 5 replicates each and different significant values are designated by different letters (PE 0.05).

treated with Mn^{2+} (0.92 ± 0.16 nKat/mg protein $^{-1}$, and 1.0 ± 0.07 nKat/protein $^{-1}$, respectively) or with 2,4-DCP (1.15 ± 0.17 nKat mg protein $^{-1}$, and 1.22 ± 0.16 nKat/protein $^{-1}$, respectively). The specific activities in Acala 44 extracts reached the level of 0.45 ± 0.11 nKat/mg protein $^{-1}$ and 0.46 ± 0.10 nKat/mg protein $^{-1}$ for control and inoculated plants, respectively, when treated with Mn^{2+} , and 0.49 ± 0.17 nKat/mg protein $^{-1}$ and 0.48 ± 0.06 nKat/mg protein $^{-1}$ when treated with 2,4-DCP.

In a separate set of experiments, 3h after Xcm- or water infiltration of the resistant variety, the NADH oxidation was 2.4-fold higher in both the apoplastic washing fluids (AWF) and the crude extracts from the infected plants respective to controls (Table 1). Although no difference was detected spectrophotometrically

Table 1 : comparison of NADH oxidation levels between crude extracts and apoplastic fluids from the resistant cultivar

	NADH oxidation (a)	
	Crude extracts	Apoplastic fluids (b)
Control (c)	0.21 ± 0.05	1.14 ± 0.58
Infected cotyledons (d)	0.5 ± 0.16	2.67 ± 0.19

(a) activity expressed as nKat/mg protein \pm SD as mean of 10 replicates (5 plants)

(b) apoplastic fluids were extracted as described in the experimental procedure section

(c) cotyledons were infiltrated with Xcm race 18

(d) cotyledons were infiltrated with water

in the guaiacol peroxidase activity of crude extracts and AWF from control and infected plants (not shown), differences in the activity of a cationic peroxidase (pI9.5) was observed on IEF gels by its guaiacol activity (Figure 6).

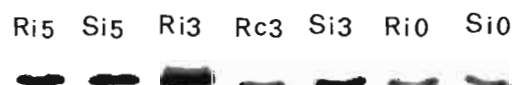


Figure 6 : Analytical isoelectric focusing (IEF) of samples separated on an IEF gel (pH 3 to 11) followed by guaiacol peroxidase staining.

R : resistant cultivar Reba B50 to Xcm race 18; S : susceptible cultivar Acala 44; i : infected with Xcm race 18; c : control (cotyledons infiltrated with water); 0, 3, 5, : time (hours) after bacterial infiltration.

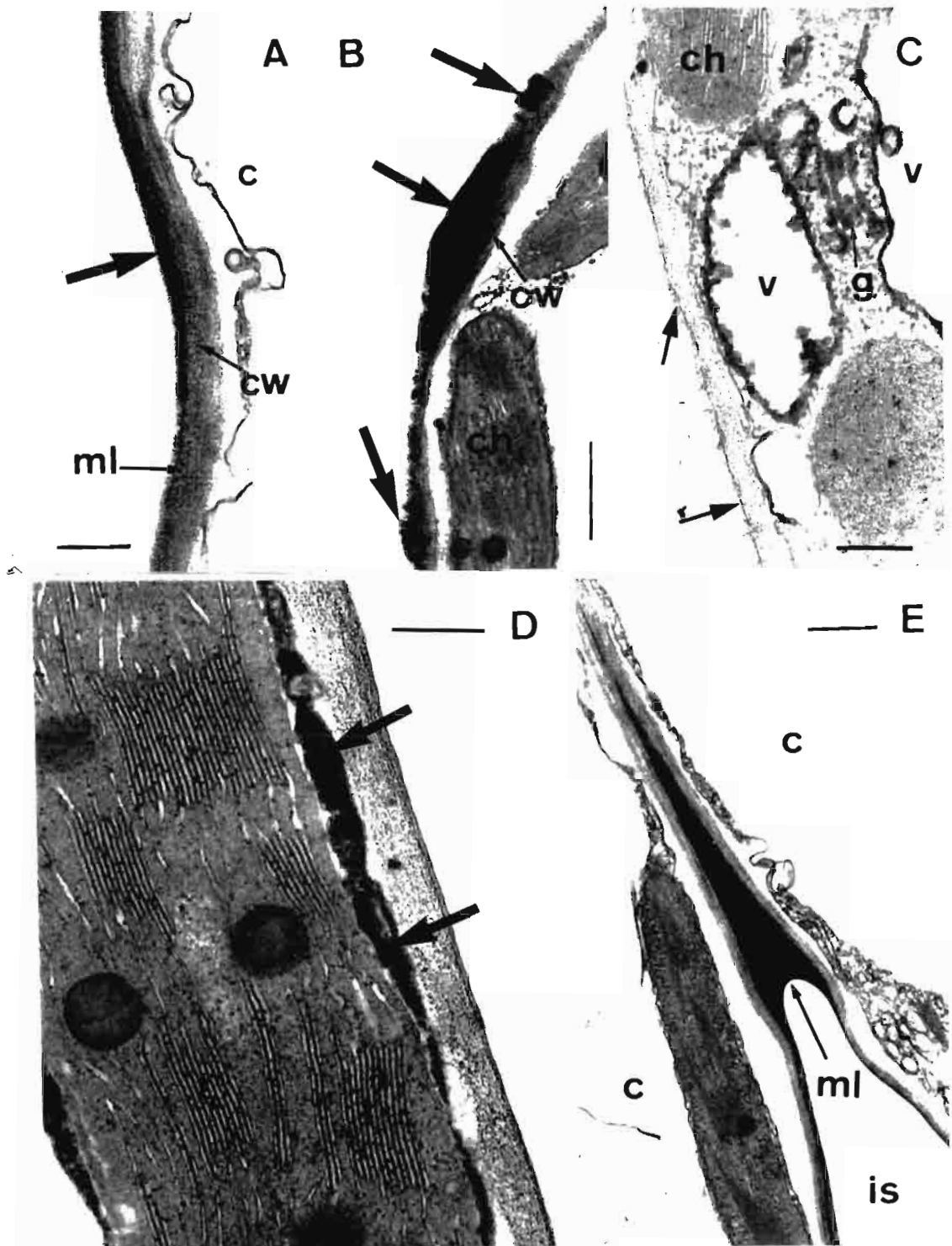


Figure 8 : Transmission electron micrographs showing the localization of peroxidase activity during an incompatible interaction, 3 h after infiltration of the cotyledons of the resistant cultivar Reba B50 with Xcm race 18.

A : a spongy mesophyll cell shows a strong peroxidase activity (arrow) located in a portion of the middle lamella (ml) and the primary cell wall (cw). The plasma membrane and the cytoplasm (c) appear altered (Bar = 0.25 μ m).

B : the cell wall (cw) of this spongy mesophyll cell displays electron-dense areas (arrows) indicating the localization of a peroxidase activity. The cytoplasm with two chloroplasts (ch) is slightly altered (Bar = 0.5 μ m).

C, D : a weak but significant activity is visible within the cytoplasm (arrows) (ch : chloroplast ; g : Golgi apparatus ; v : vacuole) (Bars : A = 0.35 μ m an B = 0.25 μ m).

E : a strong electron-density is seen in the middle lamella (ml) (c : parenchyma cells) (Bar = 0.5 μ m).

The activity of this peroxidase increased only 3 h after infection in samples from inoculated Reba B50 (Figure 6, Ri3). The optimum pH of this activity was estimated at 5 (Figure 7).

Comparatively, no apparent modifications in staining intensity of acidic peroxidase isoform activity was observed from 0 up to 12 h after infection (not shown).

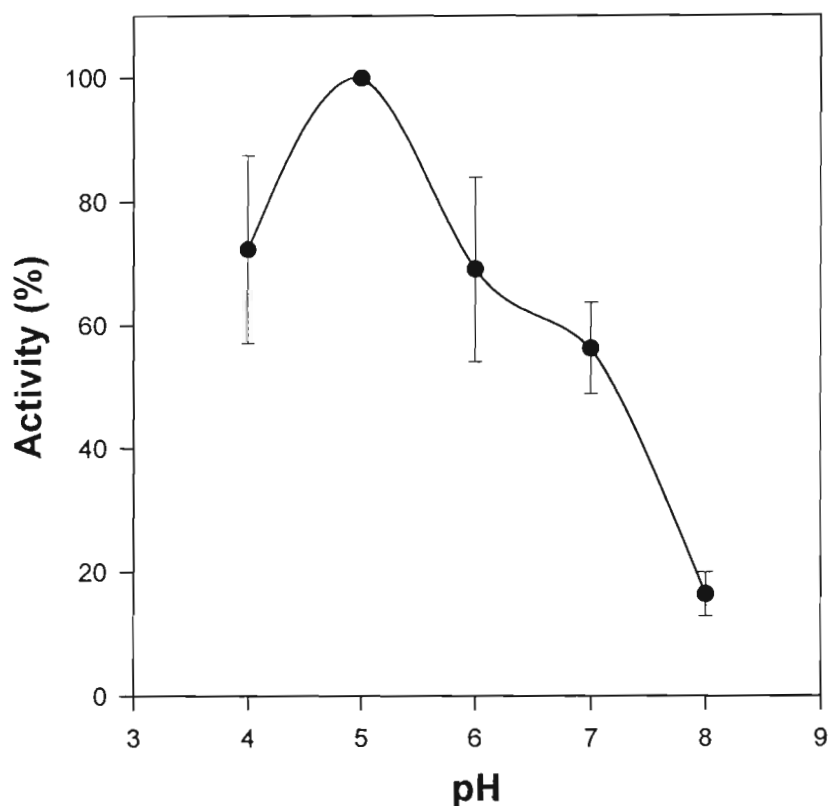


Figure 7: Optimum pH of the NADH oxidation activity measured spectrophotometrically at 340 nm.

IV- Cytochemical characterization of peroxidase activity

Electron microscope observations of sections made in infected resistant cotyledons revealed shown weak electron-dense areas in the *Xcm*-infiltrated zone 2 and 6 h after infection. In opposite, 3h after infiltration, strong electron-dense areas were seen in the spongy mesophyll of the resistant cultivar (Figures 8A, B). The middle lamella bordering intercellular spaces in the spongy mesophyll, as well as wall portions, were strongly electron-dense (Figure 9A). At this time, a weak reaction was observed in palissade mesophyll cells (Figure 9B). After

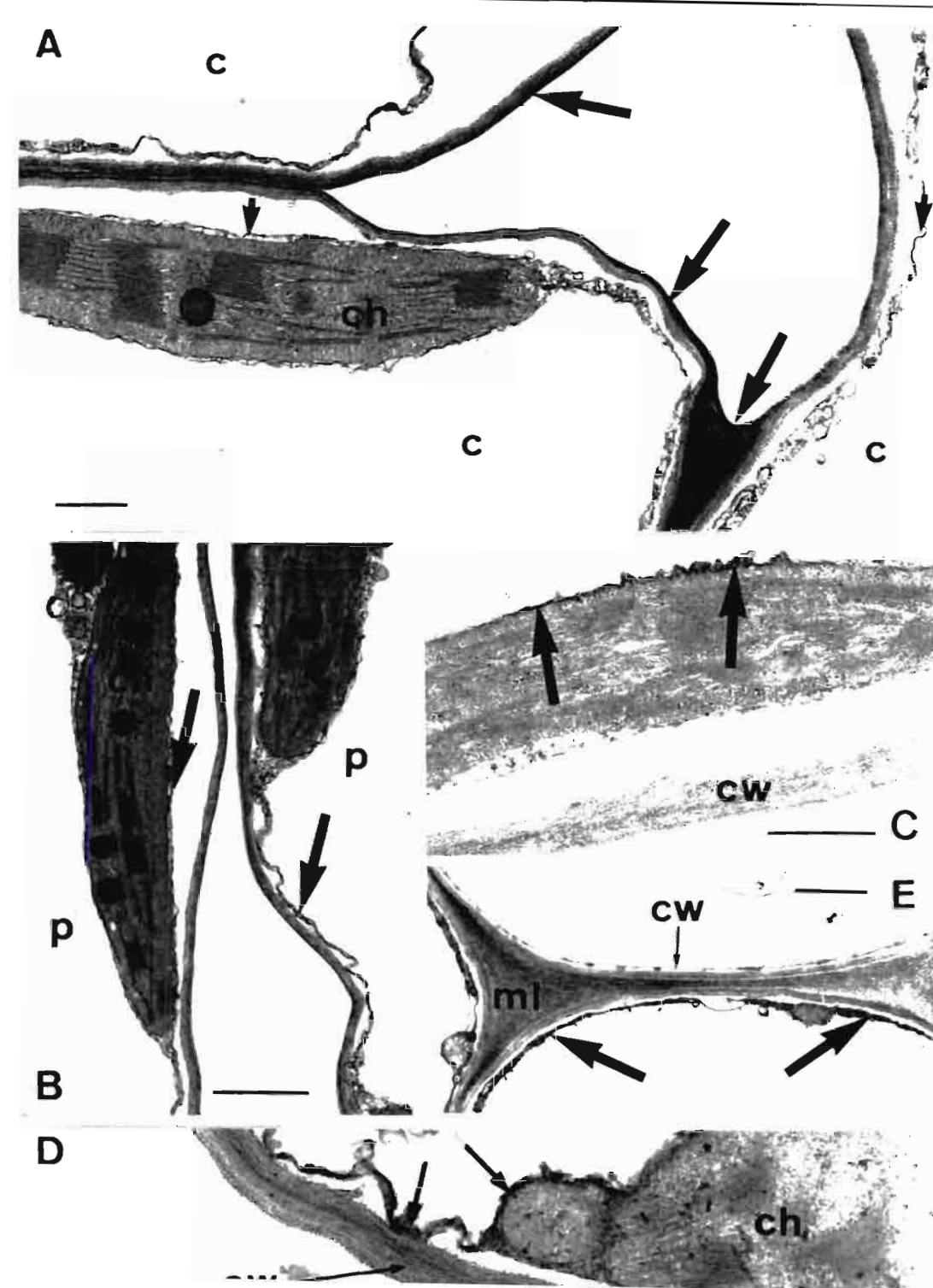


Figure 9 : A,B : Transmission electron micrographs of the localization of peroxidase activity during an incompatible interaction, 3 h after infiltration of cotyledons of resistant plants Reba B50 with Xcm race 18.

Variation in the electron-density is seen in the middle lamella (arrows) of these spongy mesophyll cells (c), indicating variation in the peroxidase activity (A). This activity is also located in the plasma membrane (arrowheads). In the palisade parenchyma cells (p) (B), a weak peroxidase activity is seen in the plasma membrane (arrows) and the cell wall (ch : chloroplast) (A : Bar = 0.5 μm ; B : Bar = 1 μm).

C : Control; Transmission electron micrograph of the localization of peroxidase activity in cotyledons, 3 h after infiltration of cotyledons of the resistant cultivar Reba B50 with diazonized water. A peroxidase activity is seen in the tonoplast of a spongy mesophyll cell as indicated by the weak electron-density (arrows). The primary cell wall (cw) and the middle lamella do not exhibit any strong electron-density as compared to that observed in cell walls of the infected plants from the resistant cultivar (Bar = 0.5 μm).

D : Transmission electron micrograph of the localization of peroxidase activity during a compatible interaction, 3h after infiltration of the cotyledons of the susceptible cultivar Acala 44 with Xcm. A slight peroxidase activity is detected in the vacuole membrane (arrows). No significant increase in the electron-density is visible in the primary cell wall (cw) of this spongy mesophyll cell, as compared to that observed in cells of the infected resistant cultivar (ch : chloroplast ; Bar = 0.5 μm).

E : Control in which H_2O_2 was omitted in the reaction volume for assessing the activity. Transmission electron micrograph of the localization of peroxidase activity during an incompatible interaction, 3 h after infiltration of the cotyledons of the resistant cultivar Reba B 50 with Xcm. A weak electron-density only is observed in the cytoplasm (arrows) and the middle lamella (ml), but not in the cell wall (cw) (Bar = 1 μm).

Table 2 : induction of HR-like symptoms in infiltrated cotyledons

Infiltration	Reba B 50 (a)			Acala 44 (a)		
	HR-like symptoms	Time (b)	Plant death (c)	HR-like symptoms	Time (b)	Plant death (c)
H ₂ O	-		-	-		-
Xcm race 18 (d)	+	18	-	-		+(30)
Xcm race 20 (d)	-		+(30)	-		+(30)
digitonin (80µM) (e)	+	18	-	+	18	-
Xcm race 18 + digitonin	+	18	-	+	18	+(120)
Xcm race 20 + digitonin	+	18	-	+	18	+(120)
2,4 DCP (17µM) (f; g)	+	24	-	+	24	-
Xcm race 18 + 2,4 DCP	+	18	-	+	24	+(90)
MnCl ₂ (2mM) (g)	±	24	-	±	24	-
Xcm race 18 + MnCl ₂	+	18	-	±	24	+(90)

(a) : the cultivar Reba B 50 is resistant to Xcm race 18, but susceptible to Xcm race 20, while the cultivar Acala 44 is susceptible to both races

(b) : time (hours) of visual detection of symptoms

(c) : observation of plant death in days postinoculation in our experimental conditions

(d) : the bacterial suspension was infiltrated at 10⁷ CFU

(e) : elicitor of active oxygen species production

(f) : 2,4 Dichlorophenol

(g) : stimulator of peroxidase activity

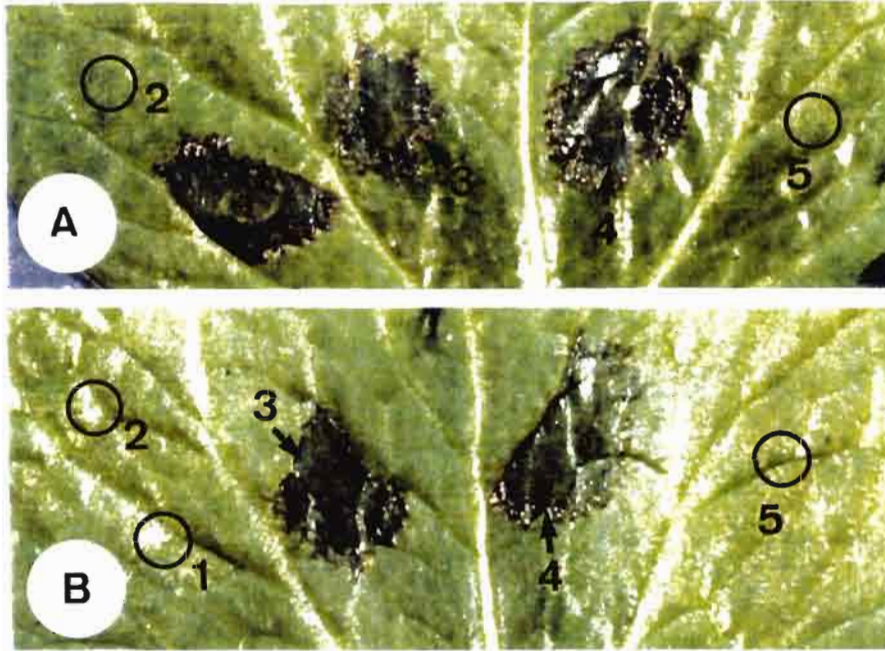


Figure 10 : Induction of HR-like symptoms.

A. In cotyledons from the resistant cultivar Reba B50, HR-like symptoms are seen at sites that were infiltrated with the avirulent race 18 (1), digitonin (3), or the virulent race 20 plus digitonin (4). When cotyledon portions were infiltrated with the virulent race 20 alone (2), or with water (5) no visible modifications of the host tissues are detected.

B. In cotyledons from the susceptible cultivar Acala 44, HR-like symptoms are seen at sites that were infiltrated with digitonin (3), or the virulent race 18 plus digitonin (4). When cotyledon portions were infiltrated with the virulent race 18 (1), race 20 (2), or with water (5) no visible symptoms are detected at the leaf surface.

injection of deionized water, cotyledons of resistant plants showed a weak electron-density in cell walls (Figure 9C). In infected cotyledons of susceptible plants, a slight peroxidase activity was found in the tonoplast (Figure 9D), but not in the middle lamella and the cell walls. Incubation of sections in medium without H₂O₂ did not induced any electron-density (Figure 9E).

V- Induction of HR-like symptoms

Eighteen hours after infiltration of cotyledons with 80 µM digitonin, HR-like symptoms were seen on both resistant and susceptible varieties at the site of infiltration (Table 2; Figure 10). When digitonin was co-inoculated to Reba B50 with the virulent race 20, or to Acala 44 with the virulent race 18, HR-like symptoms also appeared (Table 2; Figure 10). Similar symptoms were seen when cotyledons were treated with the peroxidase activator 2,4 DCP, but 24 h after infiltration. The infiltration of cotyledons with MnCl₂ did not yield typical HR-like symptoms, although apparent modifications of the infiltrated leaf surface were detected. Controls consisting in H₂O- or *Xcm* race 20-infiltrated cotyledons did not display any HR-like symptoms. Estimation of the bacterial population within the infiltrated cotyledons 72 h following inoculation indicated that in the susceptible cotyledons the number of bacterial cells was significantly lower when the pathogen was co-infiltrated with elicitors (Table 3). This suggests that growth of the co-infiltrated bacteria is delayed in the infiltrated sites. As controls, no modifications were observed in growth rate of the pathogen on medium culture when mixed with digitonin, MnCl₂, or 2,4DCP (data not shown).

Plant death normally occurred 30 to 40 days post-inoculation in the compatible interactions Reba B 50/*Xcm* race 20 and Acala 44/*Xcm* race 18. When a virulent race was co-infiltrated with digitonin, MnCl₂, or 2,4DCP in plants of both varieties, apparent signs of cotyledon death were detected at least 90 days following the treatment.

Table 3 : estimation of Xanthomonas population (x 10) in cotton cotyledons 72 hours after co-infiltration with elicitors

Infiltration	Reba b 50 (a)		Acala 44 (b)	
		P		P
H2O	0	-	0	-
Xcm race 18	2.3 ± 1.7	-	7.7 ± 1.8	-
Xcm race 18 + digitonin (80µM)	1.7 ± 0.8	P> 0.05 (ns)	3.46 ± 0.7	P< 0.0001 (s)
Xcm race 18 + 2,4 DCP (17µM)	0.14 ± 0.1	P< 0.0004 (s)	2.9 ± 1	P< 0.0001 (s)
Xcm race 18 + MnCl2 (2mM)	0.65 ± 0.4	P< 0.0004 (s)	3.6 ± 1.5	P< 0.0001 (s)

(a) : the cultivar Reba B 50 is resistant to Xcm race 18, while the cultivar Acala 44 is susceptible

Data shown are the means of ten replicates for each line ; s : significant at P< 0.05 ; ns : non significant

Discussion

An important feature of plant resistance responses towards invading pathogens is thought to be the rapid production of AOS, collectively known as the "oxidative burst" (Baker and Orlandy, 1995; Elstner and Osswald, 1994). There is valid evidence that plant AOS-producing mechanisms may closely resemble those involved in the respiratory burst in mammal phagocytes (Medhy, 1994; Sutherland, 1991), with similar features such as the presence of a plasma membrane NADPH oxidase (Desikan et al., 1996; Simon-Plas et al., 1997), the *rbohA* gene (Groom et al., 1996), immunological-related peptides (Dwyer et al., 1995; Legendre et al., 1992; Tehnaken et al., 1995), including the GTP-binding Rac2 protein (Kiefer et al., 1997). Several enzyme systems have been proposed as the source of AOS production during plant pathogenesis, including NADPH oxidase, lipoxygenase, oxalate oxidase, xanthine oxidase, and peroxidases (Baker and Orlandy, 1995; Jabs et al., 1996; Zhang et al., 1995). Production of H₂O₂ by peroxidases involving oxidation of a reductant such as cysteine or NAD(P)H by molecular oxygen was characterized several years ago (Mader and Amberg-Fisher, 1982). Recently, Bolwell et al. (1995) demonstrated that generation of H₂O₂ by peroxidases was not consistent with production of intermediate superoxide anions characteristic of the plasmalemma NADPH oxidase. Although many potential sources of AOS in plant cells have been identified, (1) the crucial role they play in plant resistance, (2) the generating system that predominates during a particular plant-microbe interaction, and (3) the mechanisms that elicits the burst remain debatable (Adam et al., 1995; Levine et al., 1994, 1996).

In this respect, several lines of evidence demonstrated in the present work that superoxide anions and hydrogen peroxide were produced during the incompatible interaction between cotton cotyledons and *Xcm*. Our data strongly

suggested that $O_2\cdot^-$ radicals were generated via an extracellular peroxidase, while the infected susceptible cotyledons did not. We also showed that the bacterial growth within the cotyledon tissues as well as the issue of the interaction can be modified by treatments of plants with compounds able to stimulate *in vitro* the NADH oxidase activity of plant peroxidases (2,4 DCP and Mn^{2+}) or to rapidly trigger a superoxide radical production in plants (digitonin).

In response to inoculation of Reba B50 cotyledons with *Xcm* race 18, a three-fold increase in the extracellular cytochrome c-reducing activity was observed relative to water controls at three hours post inoculation (p.i.), whereas activity in Acala 44 cotyledons remained unchanged. Since this reducing activity in Reba B50 cotyledons was 90 % inhibited by SOD, totally blocked by KCN, and insensitive to DPI, we postulated that the $O_2\cdot^-$ production was mediated by a peroxidase activity. Likely in response of plant tissues to wounding, a low extracellular cytochrome c-reducing activity was also measured in control cotyledon discs of both varieties; the production of radicals in cotyledons of the resistant cotton variety Reba B50 was two-fold more intense than that in cotyledonary leaves of the susceptible cotton variety Acala 44.

Treatment with digitonin, a steroid glycoalkaloid known to elicit the production of $O_2\cdot^-$ in various plant species (Doke and Chain, 1985), resulted in an immediate increase in the extracellular reducing activity in both varieties. Nevertheless, the activity in Reba B50 was again two to three fold higher than that in Acala 44. In Reba B50 cotyledons, about 80 % of the digitonin-induced reducing activity was inhibited by SOD whereas only 50 % of that in Acala 44 ones was sensitive to this treatment. This probably reflected that digitonin not only elicited the production of $O_2\cdot^-$ but additionally triggered an oxygen-independent

process able to reduce the cytochrome c. This latter process seemed to be important especially in Acala 44 plants since it represented about 50 % of the total reducing activity. An important part of the digitonin-induced activity was inhibited by DPI (more than 50 % and less than 40 % in Reba B50 and in Acala 44 cotyledons, respectively) suggesting that digitonin was able, as earlier described by Doke and Miura (1995), to stimulate a production of $O_2^{\cdot-}$ through elicitation of a NADPH oxidase activity. In addition, KCN was shown to strongly inhibit the digitonin-stimulated reducing activity in both varieties (60 and 80 % in Reba B50 and Acala 44, respectively) suggesting that part of KCN inhibition could be explained by its action on a putative digitonin-elicited peroxidase and also by its inhibition on the oxygen-independent process. From our data, it appears that in cotton cotyledons, digitonin elicited a complex multifactorial process leading to the extracellular reduction of cytochrome c. But, at least one component of this process was not dependent on oxygen - insensitive to the action of SOD - and could be inhibited by KCN, while the oxygen-dependent component was partially inhibited by DPI and by KCN. This suggests that the latter process depend on the digitonin-mediated activation of both a NADPH oxidase and a peroxidase, indicating that both cotton varieties display the two enzymatic systems, each of them being able to produce extracellular $O_2^{\cdot-}$. These observations are in accordance with previous works reporting that plant cultivars without major resistance gene(s) to their pathogens also carry the system for the oxidative burst (Doke et al., 1996). However, for different reasons which have not been further explored in this paper, the capacity of Acala 44 cotyledons to produce $O_2^{\cdot-}$ was significantly lower than that of Reba B50. Moreover, whereas the variety Acala 44 was unable to elicit any of these enzymatic systems during the first five hours following inoculation with *Xcm* race 18, infected cotyledons from Reba B50 plants

were characterized by a sharp burst of $O_2\cdot^-$ between two and three hours through the activation of a putative peroxidase. Inoculation of Reba B50 with either race 20 (compatible interaction) or heat-killed *Xcm* race 18 did not result in the development of any $O_2\cdot^-$ burst. Our data, further indicated that the potentially inducible NADPH oxidase of Reba B50 cotyledons remained silent during the early steps of the incompatible interaction.

Furthermore, whereas crude enzymatic extracts prepared from Acala 44 cotyledons inoculated with *Xcm* race 18 did not show any increase in the specific activity of NADH oxidase, this was three-fold increased three hours p.i. in Reba B50 samples. The time course evolution in the NADH oxidase activity correlated that of the AOS production. This activity was blocked by the peroxidase inhibitors, KCN and SHAM, but strongly stimulated by Mn^{2+} ions or 2,4-DCP, which were both described as powerful stimulating agents of peroxidase (Halliwell, 1978). Two striking points are worth noticing: (1) in the presence of peroxidase stimulators the oxidation of NADH was statistically similar between Reba B50 samples from inoculated and control plants; (2) in the same conditions of treatment, these activities in Acala 44 were high and even higher than that of three hours post inoculated Reba B50 samples. During the critical AOS production phase, data shown in figure 5 led us to postulate that only one third to one quarter of the potential NADH oxidase activity, measured in the presence of peroxidase stimulating agents, would be functional. Since in the presence of these activating agents samples prepared from inoculated and control plants showed no difference in the specific NADH oxidase activity, we postulated that elicitation of the putative AOS-producing peroxidase could be regulated at a post-transcriptional level. In parallel, we also showed on IEF gels that increase in the activity of a cationic peroxidase (pI 9.5) during the incompatible interaction, was

observed three hours p.i. only, the optimum pH of which was estimated at 5. This observation is different from that described by Bolwell et al. (1995) on two bean H₂O₂-generating peroxidases having a neutral and a slightly alkaline optimum pH. The specific activities in AWF preparations were about five fold higher than that assessed in the crude extracts strongly suggesting that the NADH oxidase activity in cotton was likely localized in the apoplast compartment. Our cytochemical investigations also revealed that three hours after inoculation, the activity of an extracellular peroxidase was strongly elicited in plant walls and middle lamella during the incompatible interaction. These observations are in accordance with Bolwell and coworker's assumption (1995) that AOS-generating peroxidases are wall-bound. This body of arguments strongly suggests a role for an extracellular peroxidase involved in O₂^{·-} generation during the early stages of the incompatible interaction between cotton and *Xcm*.

Generation of O₂^{·-} mediated by peroxidases was already suggested by Vera-Estrella et al. (1992) and Auh and Murphy (1995) but on fungal-elicited cell suspensions. In the opposite, although Bolwell et al. (1995) have stated that peroxidases were involved in AOS generation in French bean cells infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. They demonstrated that production of AOS was not inhibited by SOD nor measurable by the reduction of cytochrome c, concluding that superoxide anions were not produced in this system during the oxidative burst. The sharp increase in peroxidase activity observed in beans two hours following infection with *Pseudomonas* has also been associated with potential accumulation of H₂O₂ (Adam et al., 1995). We also demonstrated by epipolarized microscopical observation that H₂O₂ accumulated after infection mainly in the apoplast, likely resulting from dismutation of O₂^{·-}. In the Lettuce/*Pseudomonas* system, H₂O₂ was ultrastructurally demonstrated to be

localized in altered plant cell wall areas and in papillae formed close to the pathogen (Bestwick et al., 1997). These authors hypothesized that H₂O₂, not rapidly metabolized, plays an important role in the plasma membrane breakdown associated with cell necrosis. In this way, the function of AOS produced during the HR in *Xcm*-infected cotton cells could be closely related to the initiation of membrane lipid peroxidation as suggested, or demonstrated, in other plant/pathogen models (Hammond-Kosak and Jones, 1996; May et al., 1996; Restérucchi et al., 1996; Tzeng and de Vay, 1993). Apostol et al. (1989) suggested that H₂O₂ produced in the oxidative burst is required for longer term defense response such as lignification. The link between AOS metabolism, peroxidase, and lignification in incompatible interactions has been often reported in various systems (Ferrer and Barcelo, 1994; Levine et al., 1994; Milosevic and Sluzarenko, 1996; Olson and Varmer, 1996), namely in *Xanthomonas*-infected rice (Leach et al., 1996). In our model, although peroxidase activity and H₂O₂ were detected in walls of cells within the necrotic lesions, no lignin nor suberin deposits were histochemically evidenced at these sites. In contrast, the expression of other cotton defense genes were characterized within the HR lesions after the oxidative burst including genes involved in synthesis of (1) flavonoid that accumulated in walls, middle lamellae, and papillae nine hours p.i. (Dai et al., 1996), and (2) sesquiterpen phytoalexins twenty hours p.i. (Gorski et al., 1995).

Since rapid cell death in HR has been proposed to be a programmed response to pathogens, Greenberg and collaborators (1994) suggested that function and regulation of programmed cell death in plants may be similar to that occurring in animals (Farber et al., 1990). In this respect, similar features are shared in both animal and plant cells undergoing cell death (Levine et al., 1996; Mittler and Lam, 1996; Reyerson and Heath, 1996; Wang et al., 1996), although distinct mechanisms may occur in HR cell death (Dangl et al., 1996; Heath and Skalamera, 1997; Mittler

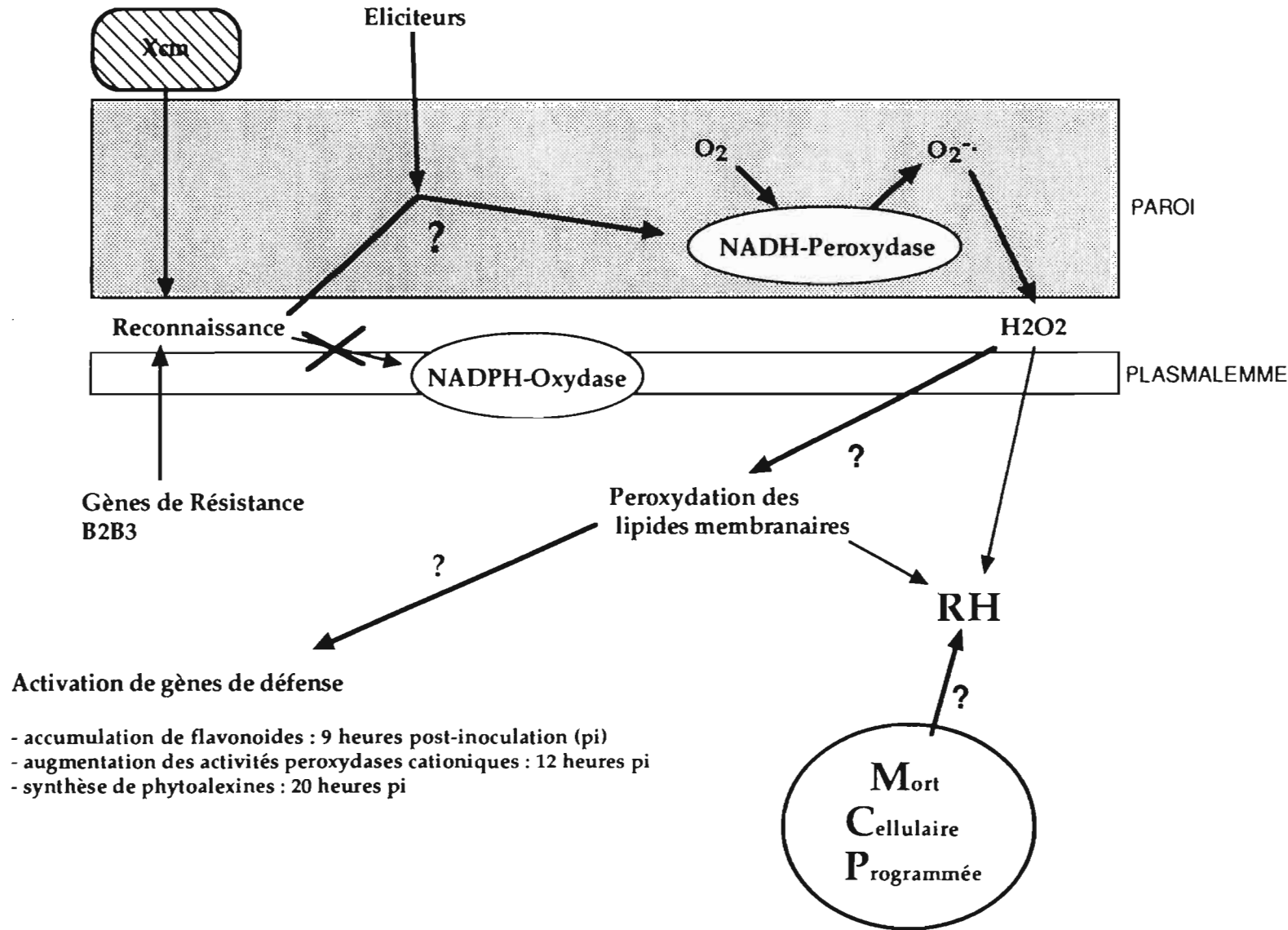


Figure 11 : Chez le cotonnier co-existent (au moins ?) deux systèmes générateurs d'O₂^{-•} : une NADPH-oxydase probablement membranaire et une NADH-oxydase apoplastique. Après reconnaissance des deux protagonistes, un mécanisme inconnu active la peroxydase qui génère des ions superoxydes, probablement dismutés en H₂O₂. Le rôle de ces formes réactives dans l'induction des gènes de défense est suggéré.

et al., 1996). AOS from the oxidative burst, including $O_2^{\cdot-}$ (Doke, 1983a, b; Jabs et al., 1996), have been postulated to play a central role in triggering HR cell death in challenged cells (Goodman and Novacky, 1994; Glazener et al., 1991; Greenberg et al., 1994; Hammond-Kosak and Jones, 1996; Levine et al., 1994; Tehnaken et al. 1995). Consistent with this AOS-mediated HR proposed model, we have shown in the present paper a close association between cotton HR expression and $O_2^{\cdot-}$ production by differential infection with virulent and avirulent races of *Xcm*. In addition, preliminary experiments (Tables 2 and 3) performed to evaluate the putative role of the AOS/peroxidase system in cotton resistance to *Xcm* suggested that digitonin, Mn^{2+} or 2,4-DCP co-infiltrated with virulent races of *Xcm* were able (1) to reduce the amount of living bacteria in HR lesions and (2) to delay plant death. These preliminary results indicated that cotton plants challenged by a virulent race of *Xcm* demonstrated the capacity to produce HR-like symptoms after such treatments, although the production of AOS was only assessed after infiltration with digitonin. Further investigation will focus on a better characterization of the apoplastic peroxidase and the associated-AOS produced in cotton cotyledons after elicitation.

Generation of $O_2^{\cdot-}$ by an apoplastic NADH-peroxidase in cotton cotyledons after *Xanthomonas* infection, despite the presence of another potent AOS-generating system, the NADPH-oxidase, open interesting avenues on the role that AOS may play in elicitation HR cell death and plant resistance (Figure 11). It has been postulated that expression of the HR phenotype varies following gene-for-gene interactions (Goodman and Novacky, 1994; Mansfield et al., 1997); accordingly, it would be of critical importance to elucidate the process by which pathogens trigger the oxidative burst. In other words, how do *hrp* genes, essential for bacteria to elicit the HR (He, 1996), mediate the eliciting mechanism since two

distinct systems are able to initiate the oxidative burst?

Experimental procedures

I- Biological materials, inoculation, and treatment of plants

The cotton varieties, Acala 44, susceptible to all *Xcm* races and Reba B 50, resistant to all of them except race 20, were grown and inoculated by infiltration of the bacterial suspension (10^7 to 10^8 colony forming unit/mL) as described by Daï et al., (1996). Controls consisted in plants from each variety that were infiltrated with sterile water.

In other set of experiments, cotyledonary leaves were also infiltrated with digitonin solutions ($80\mu\text{M}$ in water containing 0.5 % ethanol). Inoculated plants and those treated with digitonin were both assayed for their extracellular cytochrome c reducing activities.

Differentiation of HR-like symptoms was visually assessed on ten days-old cotyledons (1) infiltrated with *Xcm* race 18 or race 20, digitonin ($80\mu\text{M}$), 2,4-Dichlorophenol (2,4 DCP) ($17\mu\text{M}$), MnCl_2 (2mM), or water, or (2) co-inoculated with *Xcm* race 18 or race 20 in addition to digitonin, 2,4-DCP or MnCl_2 . Symptoms were examined each day up to 90 days after inoculation. Bacterial populations within the cotyledon infiltrated areas were estimated according to Daï et al. (1996); data were statistically analysed using ANOVA at the 0.05 level. The P values are given in Table 3.

II- Assay of extracellular cytochrome c reducing activity of cotyledon discs

The $\text{O}_2\cdot^-$ generating activity of cotyledon discs was assayed by measuring

spectrophotometrically the reduction of exogenously supplied cytochrome c (Doke, 1983a). Inoculated plants were assayed at different time after bacterial or water (control) infiltration, whereas digitonin-treated ones were tested immediately. Ten cotyledon discs (1 cm diam each) were immersed in 20 mL of a reaction mixture consisting in 20 μ M bovine heart cytochrome c, and 100 μ M deferoxamine mesylate (DFO) in 0.05M pH 7.8 potassium phosphate buffer (PBS). Trace of metal impurities were previously removed by treatment of PBS with chelex-100 (100-200 mesh) according to Sanders et al. (1994). Absorbance of the sample was measured at regular intervals at 550nm using a double beam spectrophotometer (Uvikon 922), against a reference cuvette containing the reaction buffer (PBS + 20 μ M cytochrome c + 100 μ M DFO). The $O_2^{\cdot-}$ -mediated reduction of cytochrome c was estimated by adding 1000 U m^{-1} of SOD in the reaction buffer just before addition of cotyledon discs. The $O_2^{\cdot-}$ production rates were determined by measuring the initial slopes of the curves (evolution in absorbance at 550 nm during the first 8-10 min) taking into account the inhibition scores with SOD and molar absorptivities for ferricytochrome c ($0.89 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) and ferrocyanochrome c ($2.99 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) at 550 nm. KCN (50 μ M) or SHAM (5 mM) were added to the reaction buffer before immersion of cotyledon discs to tentatively evaluate the role of peroxidases as an extracellular generator of cytochrome c reducing compounds. Similarly, diphenyleneiodonium chloride (20 μ M) (DPI) was used as inhibitor of a NADPH oxidase.

III- Preparation of crude extracts and apoplastic washing fluids (AWF) from cotton cotyledons

Cotyledons from infected plants and controls were harvested 0, 1, 2, 3, 4, 12,

24 h after inoculation. They were crushed and homogenized in 0.05M pH 6 sodium acetate buffer (2mL/g fresh weight) containing 25 mM β -mercaptoethanol, and 5% polyvinilpolypyrrolidone. After centrifugation (15 min at 12000g), the supernatant was filtered on polyether-sulfone membrane (0.45 μ m, Nalgène). AWF were prepared according to Polle et al., (1994) where sodium buffer was used instead of Mes buffer.

IV- Assay of NADH oxidase

Enzymatic activities were determined on crude extracts or on AWF. NADH oxidation activity was measuring by monitoring the decrease in absorbance at 340 nm. The reaction mixture (1 ml final volume) consisted in 50 mM pH 5 sodium acetate buffer and in 0.15 mM NADH (Halliwell, 1978). The reaction was initiated by adding the enzymatic extract (50 to 200 μ l) and was followed from 0 to 15 min. Activities were calculated using a molar extinction coefficient of 6,300 M⁻¹ cm⁻¹ for NADH. Protein concentration determined according to Bradford (1976) with BSA as a standard.

V- Isoelectric focusing method (IEF)

Crude extracts were separated under nondenaturing conditions 70mm x 80mm glass sheaths (Biorad) by IEF according to Robertson et al. (1987). The pH gradient of the gel ranged from pH 3 to 11. Ampholytes 3/10 and 9/11 (1/4, V/V) were used at a final concentration of 12% (V/V). The anode solution consisted in 20 mM acetic acid and the cathode solution in 25 mM NaOH. After migration, peroxidases were localized by incubating gels in a staining buffer consisting in 0.05M pH6 sodium phosphate buffer containing guaiacol 0.2% (W/V), 0.01% 3-amino-9-ethylcarbazole (W/V), and 0.03% (V/V) H₂O₂. The lane of gel corresponding to the isoelectric point marker was cut off and stained with

Coomassie blue R-250 (Neuhoff et al., 1988). In the absence of H_2O_2 no staining was observed.

VI- Ultrastructural localization of peroxidase activity

Cytochemical localization of peroxidase activity at the ultrastructural level was performed as previously described (Mueller and Beckman, 1978). Fragments of cotyledons were sampled 2, 3, and 6h postinoculation and fixed in 2.5% (V/V) glutaraldehyde in 0.05M phosphate buffer (pH 6.8) for 1 h, washed in buffer for 30 min, and incubated at 37°C for 3 h in a solution of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) consisting of 5 mg DAB in 10 mL 0.05M pH 7.6 Tris-HCl buffer and 0.1mL 1% (V/V) H_2O_2 . Following incubation, all preparations were postfixed in 2% (W/V) OsO_4 for 1 h, washed in distilled water, dehydrated in graded ethanol series and embedded in Epon 812 before being examined in a Jeol 100X electron microscope operating at 80Kv. The peroxidase activity was detected as strongly electron-dense deposits. Control material was incubated in the medium (1) in the absence of H_2O_2 or (2) containing 0.05 M 3-amino-1,2,4-triazole (AT) in order to inhibit catalase if present (Fredericks and Neucomb, 1969); if this last treatment fails to reduce staining, peroxidase is assumed to be involved.

VII- Histochemical localization of hydrogen peroxide

Localization of H_2O_2 production sites was performed as described by Czaninski et al., (1993). Small fragments were collected 2, 4, and 6 h postinoculation from infected or healthy cotyledons of both cultivars. They were incubated 2 h in one of the following media (a) 5 mM $CeCl_3$ in 0.05 M Tris-maleate buffer pH 5; (b) $CeCl_3$ solution containing 0.02 M aminotriazole in order to inhibit catalase, and (c) Tris-maleate buffer pH 5 alone. After washing with

buffer, samples were fixed, dehydrated and embedded in Epon 812. Semi-thin sections (1.5 μm) were examined with a Leitz Diaplan microscope using epipolarized fluorescence light (Liu et al., 1995). Refractive particles of cerium perhydroxide deposits appeared fluorescent when observed with the polarization filter block.

Acknowledgements

The authors kindly acknowledge Dr. R. Ranjeva (Université P. Sabatier, Toulouse, France) and Dr. J.P. Blein (Inra, Dijon, France) for critical reading of the manuscript. We thank Dr. AM. Catesson for helpful discussion on peroxidase cytochemistry.

CHAPITRE 3

Place des peroxydases dans
la réponse systémique acquise.

Le rôle de l'acide salicylique dans l'activation de
peroxydases

RESUME

La préinoculation des cotylédons des deux variétés de cotonnier (*Gossypium hirsutum*) par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Xcm) conduit à une inhibition de la multiplication bactérienne dans les feuilles post-inoculées avec la race 18 ou 20. L'inhibition est proportionnelle au niveau d'activité peroxydasique systémiquement induite dans les feuilles. Des analyses d'acide salicylique (AS) révèlent une concordance dans le temps entre le niveau d'AS et celui de l'activité peroxydasique dans les feuilles lors de l'interaction incompatible. Dans ce cas, les peroxydases peuvent être considérées comme des marqueurs de la résistance systémique acquise (SAR). Le temps de "latence" séparant l'inoculation des cotylédons du déclenchement de la SAR est évalué à trois heures. Au delà de trois heures post-inoculation, l'ablation des cotylédons infectés n'interfèrent plus sur le déclenchement de la SAR. Lors de l'interaction compatible, l'augmentation systémique d'activité peroxydasique dans les feuilles ne semble pas être liée à une accumulation d'AS. Le temps de "latence" séparant l'inoculation des cotylédons du déclenchement de la SAR est cette fois de quarante-huit heures.

Dans le cas de l'interaction incompatible, un pic d'AS est détecté entre trois et six heures après l'inoculation succédant au burst oxydatif. L'infiltration de H₂O₂ (200mM) dans les cotylédons provoque une accumulation d'AS dans les cotylédons et dans les feuilles. L'infiltration d'AS (2mM) dans les cotylédons induit une augmentation d'activité peroxydasique dans les cotylédons et dans les feuilles. Ces résultats suggèrent que le burst oxydatif serait l'évènement déclenchant l'accumulation d'AS dans les cotylédons, pour assurer la résistance locale acquise (LAR). Parmi les produits de gènes de défense caractérisés localement lors de la résistance, on observe l'accumulation de flavonoïdes et de composés terpéniques, dans les zones d'infiltration. Une telle accumulation n'a pas été observée lors de l'interaction compatible.

Le burst oxydatif pourrait être également le "signal" observé trois heures post-inoculation qui induit la SAR dans les feuilles non inoculées.

INTRODUCTION

Les plantes ont développé une panoplie extraordinairement diversifiée de systèmes de protection qui leur permettent de résister à de nombreux parasites et ravageurs. Certains de ces mécanismes de défense préexistent chez l'hôte sain et lui confèrent un comportement général de résistance hautement efficace. Il peut s'agir, par exemple, de barrières morphologiques qui empêchent, ou limitent, la pénétration ou le développement des micro-organismes, à l'image de la cuticule des feuilles.

D'autres mécanismes de protection sont élicités en réponse à l'agression parasitaire se traduisant par le déclenchement d'une cascade d'évènements métaboliques au site d'infection et dans les cellules saines entourant les points d'attaques. Parmi ces évènements métaboliques figure l'accroissement de la biosynthèse de nombreuses protéines (enzymes de la voie des phénylpropanoïdes, par exemple) et d'une grande diversité de métabolites secondaires dont certains - les phytoalexines - ont un effet direct sur les parasites, tandis que d'autres, tels que l'acide salicylique (AS), jouent un rôle plus central dans l'élicitation des réactions de défense (Yalpani et al., 1993). On assiste également au renforcement des parois cellulaires par des molécules telles que la lignine ou la subérine, ou par des protéines riches en hydroxyproline (HRGP) (Sheng et Showalter, 1994). Parmi les multiples enzymes et protéines activées ou surproduites, figurent les peroxydases, les polyphénoloxydases et les PR-protéines (Pathogenesis Related proteins) détectées dans de nombreuses plantes dans différentes situations pathologiques (Gianninazi et al., 1970; Van Loon et Van Kammen, 1970; Bol et al., 1990; Cutt et Klessig, 1992; Linthorst, 1991). Stinzi et al., (1993) rapportent l'existence, chez le tabac, de PR protéines caractérisées comme étant des amylases, des inhibiteurs de protéases microbiennes et des peroxydases induites lors de l'infection par le TMV. Par ailleurs, Ross (1961) and Kuc (1982) ont clairement démontré que l'infection pouvait provoquer une résistance localisée contre une attaque

ultérieure par d'autres agents pathogènes. L'ensemble des réactions qui confèrent cette immunité à la plante est appelé "Résistance locale Acquisée" (LAR: Local Acquired Resistance).

Cette résistance, exprimée au niveau des tissus attaqués, peut se généraliser à la plante de façon systémique dans les tissus les plus éloignés du site d'infection, voire dans d'autres organes. Ce type de résistance, déclenché à distance contre l'agression par d'autres agents pathogènes, est appelée "résistance systémique acquise" (SAR: Systemic Acquired Resistance); elle confère une protection contre un grand nombre d'agents pathogènes (Sticher et al., 1997).

La SAR est caractérisée par la formation de lignine et de papilles dans les organes non infectés, et l'accumulation de PR protéines (Sticher et al., 1997). Les mécanismes associés à la SAR ont fait l'objet de nombreux travaux (Kessmann et al. 1994; Raskin, 1992) dans lesquels des ions comme le calcium et des molécules telles que l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique (AS) ont été reconnus comme étant impliqués dans l'induction de réponses systémiques. L'AS occupe une place particulière en raison de ses propriétés pharmaceutiques et antimicrobiennes à la fois dans le monde végétal et animal. Le mode d'action de l'AS dans l'induction de la résistance chez les plantes est mal connu, mais l'application d'AS à un tissu végétal induit l'expression de PR-protéines et l'établissement de la SAR (Bi et al., 1995). L'observation d'une activité catalase inhibée par l'AS a mené à la conclusion que l'AS agissait dans les premières étapes de l'infection en provoquant l'augmentation de la concentration en H_2O_2 (Chen et al., 1993; Sanchez-Casas et Klessig, 1994). Rao et al., (1997) ont suggéré que l'AS provoque l'activation de la biosynthèse de protéines capables de générer du peroxyde d'hydrogène. En opposition avec ces données, l'augmentation des formes réactives de l'oxygène dans la plante est reconnue dans de nombreux modèles comme étant la première réponse active générée dans les interactions incompatibles (Mehdy, 1994; Hammond-Kossack et Jones, 1996). Le peroxyde d'hydrogène induit effectivement la biosynthèse d'AS (Léon et al., 1995; Summer-Matter et al., 1995) et joue un rôle central dans le déroulement de la RH et l'induction de différents gènes de défense (Levine et al., 1994). Il apparaît cependant que les relations entre l'AS et le burst oxydatif ne sont pas encore établies avec certitude et suscitent actuellement un débat scientifique passionné.

Lors de l'interaction incompatible entre le cotonnier et *Xcm*, une forte augmentation d'activité peroxydasique dans les cotylédons a été observée dès dix heures après l'inoculation. Cette augmentation de l'activité est liée à l'activation de deux isoformes acides. Vingt-quatre heures après l'inoculation des cotylédons, une augmentation d'activité liée cette fois à l'activation des cinq isoenzymes acides a été détecté dans les feuilles non infectées. Les techniques d'histochimie ont permis de détecter les activités peroxydasiques dans les cellules du mésophylle lacuneux au niveau des sites d'infiltration dès quatre heures après l'inoculation.

Le rôle de ces peroxydases associées à la résistance du cotonnier contre *Xcm* sera discuté dans ce chapitre. La majeure partie de cette étude sera focalisée sur le rôle de l'AS dans l'induction systémique de l'activité peroxydasique lors de l'interaction incompatible entre le cotonnier et *Xcm*. Une relation possible entre le burst oxydatif, l'AS et la SAR induite lors de l'interaction incompatible entre le cotonnier et *Xcm* sera étudiée.

MATERIELS et METHODES

Les caractéristiques du matériel végétal et de l'agent pathogène, les conditions de culture et le protocole d'infection artificielle ainsi que les méthodes employées pour le comptage bactérien et le dosage de l'activité peroxydasique sont décrits dans le chapitre I.

I- Numération bactérienne dans les feuilles inoculées par *Xcm* race 18, après une pré-inoculation des cotylédons avec *Xcm* race 18 ou 20.

Les cotylédons des deux variétés sont inoculés avec une suspension bactérienne de 10^8 unités formant colonies/mL (ufc/mL) de *Xcm* race 18 ou 20. Soixante douze heures après cette inoculation, les premières feuilles au-dessus des cotylédons sont inoculées par *Xcm* race 18 ou 20. Le comptage des bactéries est effectué sur les feuilles 4 jours après leur inoculation. La densité bactérienne est exprimée en ufc $\times 10^5$ /cm² de cotylédons. Le pourcentage d'inhibition de la multiplication bactérienne est calculé par rapport à la densité bactérienne dans les feuilles de la même variété dont les cotylédons ont été préinfiltrés avec de l'eau.

Les valeurs et les écart-types sont calculés sur 10 essais. Pour chaque essai, les analyses sont effectuées sur 2 feuilles provenant du même individu.

II- Dosage de l'acide salicylique (AS) endogène libre.

Les cotylédons des plants de cotonniers de la variété Acala 44 et Réba B50 inoculés avec *Xcm* race 18 et leur pétiole, ainsi que les premières feuilles et leur pétiole sont prélevés à différents temps après l'inoculation. Les feuilles et les cotylédons sont coupés longitudinalement en bandelettes très fines, et sont positionnés verticalement dans un tube à centrifuger. Le liquide intercellulaire et phloémique est récolté par centrifugation (5000g), et est récupéré dans une solution aqueuse à 50% de méthanol (v/v). Chaque échantillon est analysé par HPLC (Chromatographie liquide à haute performance) sur colonne C18 "Lichrospher 100 Rp 18" (250 \times 4,6mm; 5 μ m), équilibrée dans un mélange formé de 95% de tampon acétate de sodium 50 mM, pH4,5 et 5% d'acétonitrile. L'acide

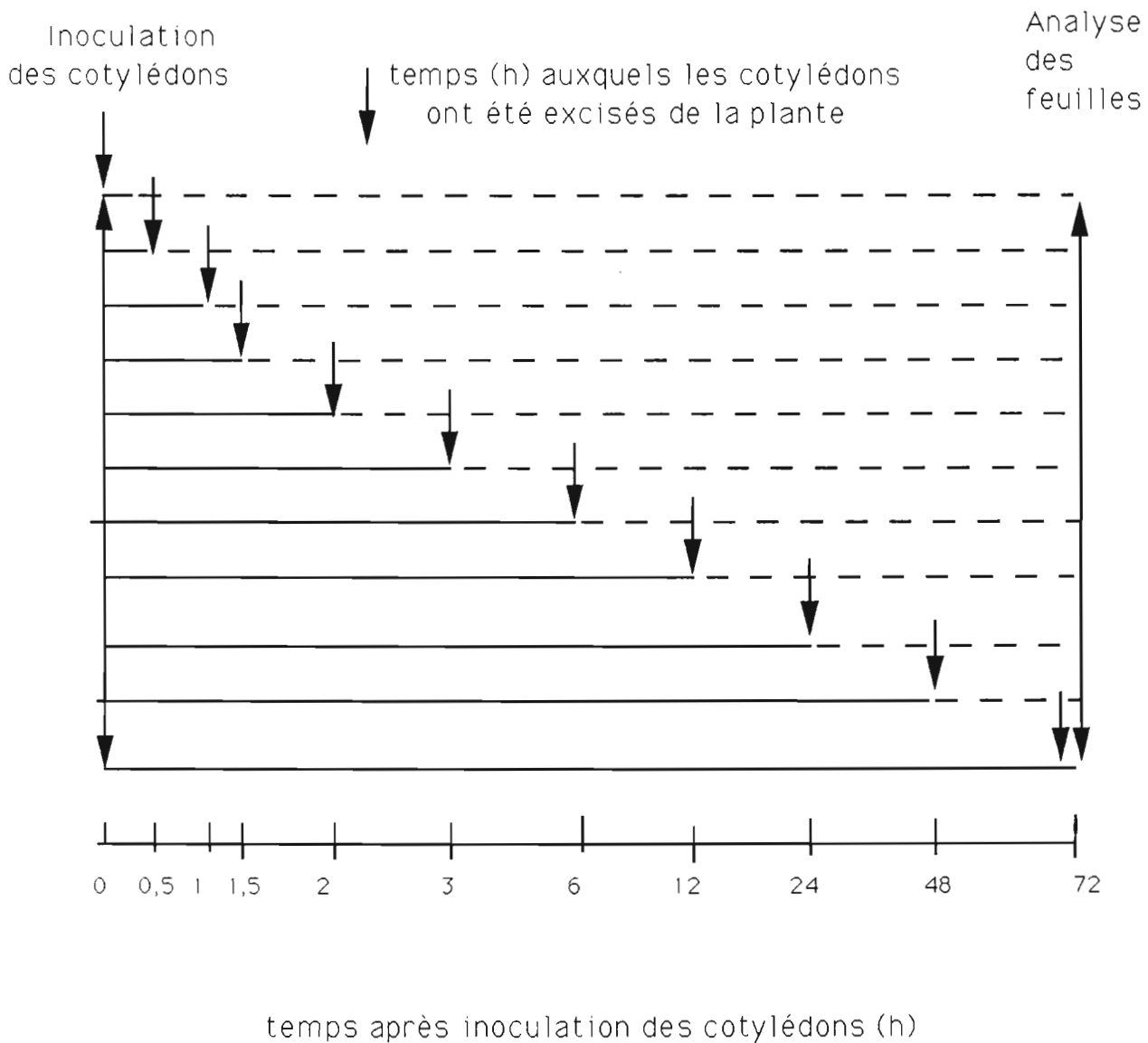


Figure 1. Schéma explicatif de la technique d'ablation des cotylédons afin de déterminer le temps de déclenchement du signal responsable de la SAR.

salicylique, élué après un temps de rétention de 15 min à un débit de 2 mL/min, est détecté par fluorescence par un spectrofluorimètre (excitation à 290 nm, émission à 402 nm). Parallèlement, les analyses sont effectuées sur des plants de cotonnier dont les cotylédons ont été infiltrés avec de l'eau stérile. Une injection témoin d'AS a été effectuée dans les mêmes conditions expérimentales, afin de déterminer préalablement les conditions d'éluion. Dans le but de vérifier l'identité de l'AS extrait des cotylédons, un contrôle a été effectué par analyse spectrale du produit d'éluion, et comparé avec celui de l'AS pur commercialisé.

Les valeurs et les écarts-types sont calculés sur 10 essais. Pour chaque essai, les analyses sont effectuées sur 2 feuilles ou 2 cotylédons provenant du même individu.

III- Détermination du temps de "latence" séparant l'inoculation des cotylédons du déclenchement de la SAR (accumulation de l'AS et de l'activité peroxydasique dans les feuilles non inoculées) lors de l'interaction incompatible.

Après infiltration des cotylédons de la variété Réba B50 par *Xcm* race 18 ou 20, ceux-ci sont détachés de la plante 0, 30min, 1h, 1h 30min, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 72h après l'inoculation. Les deux premières feuilles non inoculées sont quant à elles systématiquement analysées 72h après l'inoculation des cotylédons, quel que soit le temps auquel ils ont été récoltés après inoculation (0, 30min, 1h.....) (Figure 1). Par cette technique, on détermine le temps nécessaire à l'élaboration et à la transmission depuis le cotylédon jusqu'à la tige, du signal déclenchant ultérieurement la SAR dans le premier étage foliaire. Comme indicateur de la SAR, nous avons choisi l'augmentation de l'activité peroxydasique et de l'accumulation de l'acide salicylique dans le premier étage foliaire.

IV- Effet de l'infiltration de H₂O₂ exogène sur l'activité peroxydasique et sur la teneur en AS dans les cotylédons et dans les feuilles

L'infiltration de H₂O₂ (200mM) est effectuée à la face inférieure des cotylédons des deux variétés à l'aide d'une seringue dépourvue d'aiguille. Après différents prélèvements aux temps 0, 1, 2, 3, 6, 12 et 24h après l'infiltration, l'analyse du taux d'AS libre et de l'activité peroxydasique est effectuée sur les cotylédons et sur le premier rang foliaire. La teneur en AS est exprimée en µg d'AS/g de matière fraîche; l'activité peroxydasique est exprimée en nKat/mg de

protéines X 1000. Les valeurs et les écarts types sont calculés sur 10 essais. Pour chaque essai, les analyses sont effectuées sur 2 feuilles ou 2 cotylédons provenant du même individu.

Parallèlement, une analyse du profil enzymatique des peroxydases est effectuée par IEF sur les cotylédons et sur les feuilles après infiltration du peroxyde d'hydrogène dans les cotylédons, afin de déterminer les isoformes induites sur le site de l'infiltration et celles induites systématiquement. Les peroxydases sont extraites après broyage des cotylédons et des feuilles.

V- Effet de l'AS exogène sur l'augmentation d'activité totale des peroxydases dans les cotylédons et dans les feuilles

L'infiltration d'AS (2mM) est effectuée à la face inférieure des cotylédons des deux variétés de cotonnier à l'aide d'une seringue dépourvue d'aiguille. Après différents prélèvements aux temps 0, 30min, 1h, 1h 30min, 3h, 6h, 12h et 24h après l'infiltration, l'analyse de l'activité peroxydasique est effectuée sur les cotylédons et sur les feuilles. La teneur en AS est exprimée en µg d'AS/g de matière fraîche.

Parallèlement, une analyse du profil enzymatique des peroxydases est effectuée par IEF sur les cotylédons et sur les feuilles après infiltration de l'AS dans les cotylédons, afin de déterminer les isoformes induites sur le site de l'infiltration et celles induites systématiquement. Les peroxydases sont extraites après broyage des cotylédons et des feuilles.

VI- Observations histochimique et cytologique

1-Histochimie des composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été recherchés dans la variété sensible et la variété résistante, saines et infectées: flavonoïdes, lignine, catéchine, subérine.

2-Histochimie des composés terpéniques

Les terpènes, aldéhydes et naphtols sont cytolocalisés par le chlorure d'antimoine (Daï et al., 1996). Plusieurs composés de cette famille chimique ont été classés dans le groupe des phytoalexines par Essenberg et Pierce (1994).

3-Immunolocalisation de la callose

Un anticorps polyclonal dirigé contre les β -1,3-glucanes a été utilisé pour immunolocaliser la callose dans les zones cotylédonnaires infiltrées par *Xcm* race 18 selon le protocole décrit par Dai et al. (1996). L'observation est réalisée en épifluorescence.

Préinoculation (1) des cotylédons de la variété Réba B50 par

Post-inoculation des feuilles (2)	Xcm race 18		Xcm race 20		H2O (témoins)	
	Xcm race 18	Xcm race 20	Xcm race 18	Xcm race 20	Xcm race 18	Xcm race 20
Densité bactérienne (3)	63 ± 5	900 ± 52	87 ± 11	1965 ± 110	130 ± 15	3024 ± 110
% d'inhibition (4)	51,5	70,24	33	35		

Tableau 1 A : Estimation de la population bactérienne dans les feuilles inoculées de la variété Réba B50 suite à une pré-inoculation des cotylédons par la race virulente (race 20) ou avirulente (race 18) de Xcm

Préinoculation (1) des cotylédons de la variété Acala 44 par

Post-inoculation des feuilles (2)	Xcm race 18		Xcm race 20		H2O (témoins)	
	Xcm race 18	Xcm race 20	Xcm race 18	Xcm race 20	Xcm race 18	Xcm race 20
Densité bactérienne (3)	4102 ± 85	3995 ± 80	4195 ± 101	4328	5002 ± 230	5311 ± 80
% d'inhibition (4)	18	20,2	21	18,5		

Tableau 1 B : Estimation de la population bactérienne dans les feuilles inoculées suite à une pré-inoculation des cotylédons par les deux races virulentes (race 20 et race 18 de Xcm

(1) les cotylédons sont inoculés par Xcm race 18 ou 20, ou seulement infiltrés avec de l'eau.

(2) Soixante douze heures après l'inoculation ou l'infiltration par de l'eau, les feuilles du rang supérieur sont inoculées à leur tour par Xcm race 18 ou 20.

(3) Le comptage des bactéries est effectué sur les feuilles 4 jours après leur inoculation.

La densité bactérienne est exprimée en ufc X 100000/cm² de cotylédon

(4) Le pourcentage d'inhibition de la multiplication bactérienne est calculé en fonction de la densité bactérienne dans les feuilles des plants dont les cotylédons ont été infiltrés avec de l'eau (témoin).

RESULTATS

I- Comptage de bactéries dans les feuilles inoculées par *Xcm* 72h après une pré-inoculation des cotylédons avec *Xcm* race 18 ou 20.

Les cotylédons de chaque variété sont inoculés par *Xcm* race 18 ou 20. Soixante douze heures après, les feuilles des deux variétés sont inoculées par *Xcm* race 18 ou 20. Le comptage des bactéries est effectué sur les feuilles 4 jours après leur inoculation (Tableau 1A et 1B).

La pré-inoculation des cotylédons de la variété Réba B50 lors de l'interaction de type incompatible (Réba B50/*Xcm* race 18) (Tableau 1A), conduit à une inhibition de la multiplication bactérienne dans les feuilles post-inoculées par l'une ou l'autre des deux races (51,5% d'inhibition lorsque la variété Réba B50 est post-inoculée par *Xcm* race 18, et 70,24% d'inhibition lorsque les feuilles de la variété Réba B50 sont inoculées par *Xcm* race 20) (Tableau 1A).

Lorsque la pré-inoculation des cotylédons concerne une interaction compatible (Réba B50/race 20; Acala 44/race 18 ou race 20), l'inhibition de la multiplication de la souche virulente est comprise entre 18% et 21% pour la variété Acala 44 et 33% à 35% pour la variété Réba B50 (Tableau 1A et 1B).

II- Cinétique d'apparition de l'acide salicylique (AS)

Les cotylédons de la variété Réba B50 et de la variété Acala 44 sont respectivement inoculés par *Xcm* race 18. L'extraction de l'AS est effectuée à 0, 1h, 3h, 6h, 12h, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 jours après l'infiltration de la bactérie.

Dans les cotylédons infectés de la variété Réba B50 inoculée, on observe un "pic" d'AS entre 3h et 12h. Une forte augmentation d'AS est ensuite détectée dans les cotylédons et les feuilles de la variété Réba B50 à partir de 12 h après l'infection (Figure 2).

Dans le cas de la réaction compatible (Acala 44/*Xcm* race 18), aucune variation d'AS n'est observée au cours du temps. De même l'infiltration des cotylédons des deux variétés avec de l'eau stérile ne provoque pas d'accumulation d'AS.

Ablation des cotylédons après inoculation (h)	AS dans les cotylédons (1)	AS dans les feuilles (2)	Activité peroxydasique foliaire (3)
0	0	0	70 ± 18
0,5	0	0	72 ± 20
1	0	0	75 ± 15
1,5	0	0	69 ± 12
2	0	0	74 ± 11
3	0,08 ± 0,01	0,67 ± 0,13	245 ± 13
6	0,3 ± 0,015	0,65 ± 0,1	237 ± 20
12	0,05 ± 0,01	0,68 ± 0,2	241 ± 15
24	0,64 ± 0,12	0,68 ± 0,2	248 ± 25
48	1,4 ± 0,2	0,65 ± 0,1	238 ± 20
72	1,6 ± 0,2	0,65 ± 0,14	245 ± 12

Tableau 2 : Dosage de l'AS cotylédonnaire et foliaire de la variété Réba B50 après ablation des cotylédons inoculés par Xcm race 18 et mesure de l'activité peroxydasique foliaire (interaction incompatible).

(1) La teneur en AS est analysée dans les cotylédons dès l'ablation. La concentration en AS est exprimée en µg/g de Matière Fraiche

(2) La teneur en AS dans les feuilles est analysée 72h après l'inoculation des cotylédons, quel que soit le temps auquel ils ont été excisés de la plante

(3) L'analyse de l'activité peroxydasique est effectuée dans les feuilles 72h après l'inoculation des cotylédons. L'activité peroxydasique est exprimée en nkat/mg de protéine.

Ablation des cotylédons après inoculation (h)	AS dans les cotylédons (1)	AS dans les feuilles (2)	Activité peroxydasique foliaire (3)
0	0	0	70 ± 18
0,5	0	0	72 ± 20
1	0	0	71 ± 15
1,5	0	0	69 ± 12
2	0	0	70 ± 11
3	0	0	69 ± 10
6	0	0	65 ± 25
12	0	0	72 ± 32
24	0	0	69 ± 15
48	0	0	215 ± 21
72	0	0	210 ± 12

Tableau 3 : Dosage de l'AS cotylédonnaire et foliaire de la variété Réba B50 après ablation des cotylédons inoculés par Xcm race 20 et mesure de l'activité peroxydasique foliaire (interaction compatible)

(1) La teneur en AS est analysée dans les cotylédons dès l'ablation. La concentration en AS est exprimée en µg/g de Matière Fraiche

(2) La teneur en AS dans les feuilles est analysée 72h après l'inoculation des cotylédons, quel que soit le temps auquel ils ont été excisés de la plante

(3) L'analyse de l'activité peroxydasique est effectuée dans les feuilles 72h après l'inoculation des cotylédons. L'activité peroxydasique est exprimée

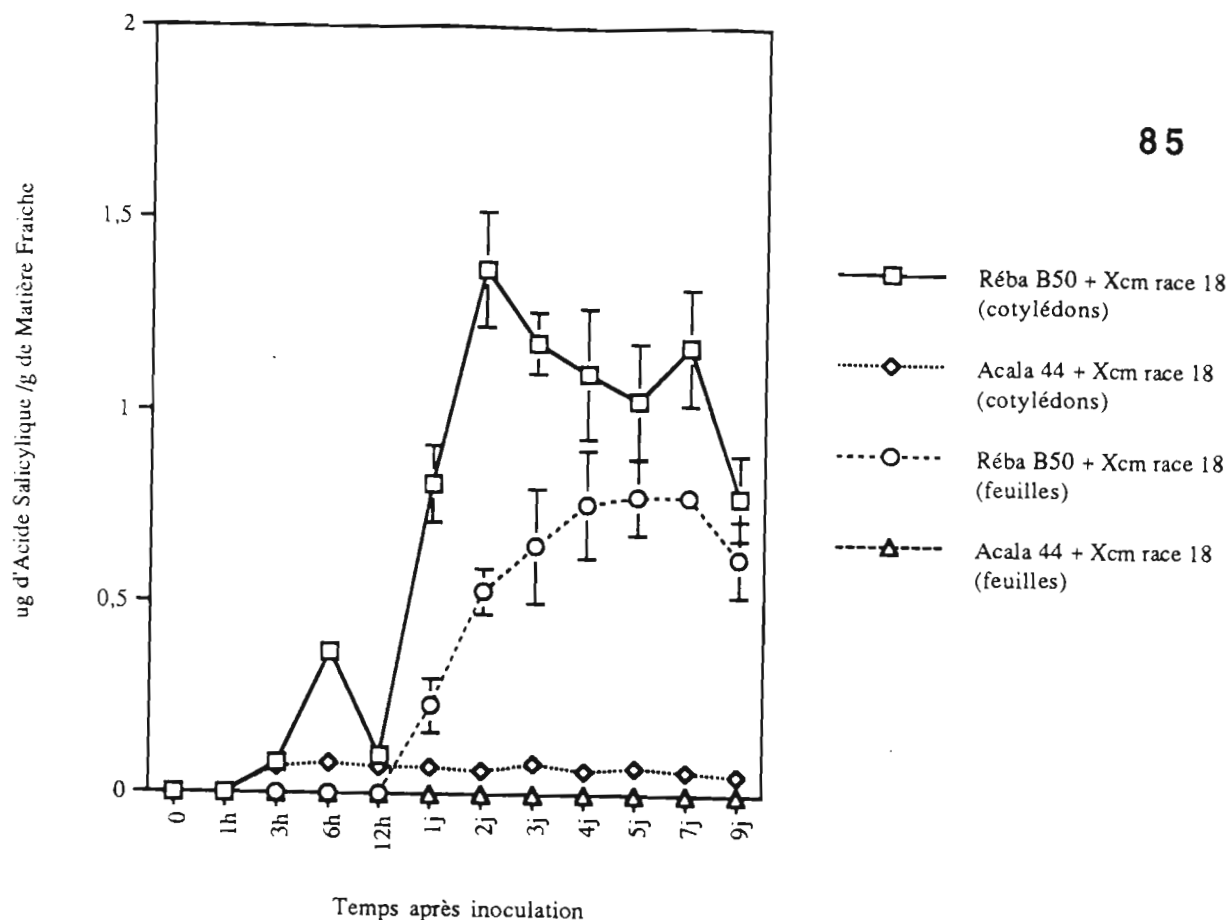


Figure 2: Détection de l'AS dans les cotylédons inoculés par *Xcm* race 18 et dans les premières feuilles non traitées, chez la variété Réba B50 et Acala 44.

Seuls les cotylédons sont inoculés par *Xcm* race 18 ou infiltrés avec de l'eau. A chaque temps, les cotylédons et les premières feuilles du rang supérieur sont prélevés simultanément. L'analyse de la teneur en AS est effectuée par HPLC sur le liquide intercellulaire des cotylédons et des feuilles. Les moyennes et les écart-types sont calculés d'après les résultats obtenus sur 10 individus.

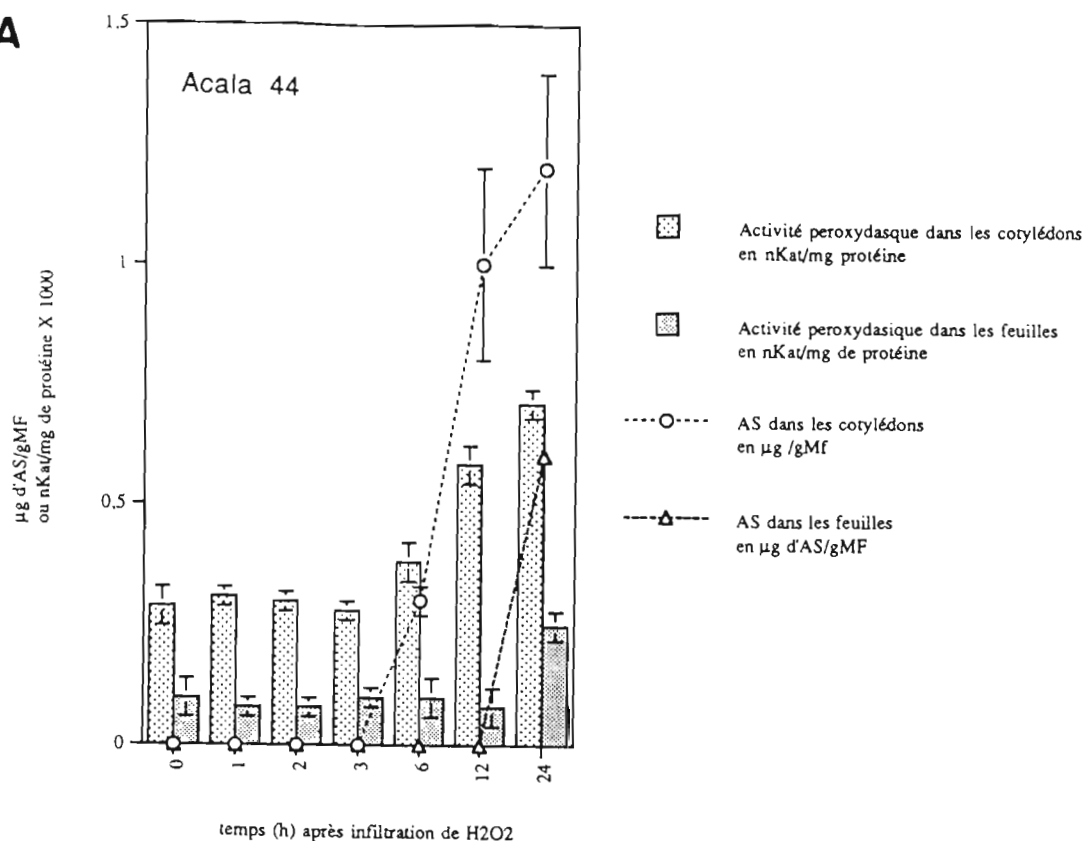
III- Détermination du temps de "latence" séparant l'inoculation des cotylédons du déclenchement de la SAR (accumulation de l'AS et de l'activité peroxydasique dans les feuilles non inoculées) lors de l'interaction incompatible.

Les cotylédons de la variété Réba B50 inoculés par *Xcm* race 18 ou 20 sont détachés de la plante 0, 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 72h après l'inoculation avec *Xcm* race 18 (Tableau 2 et 3).

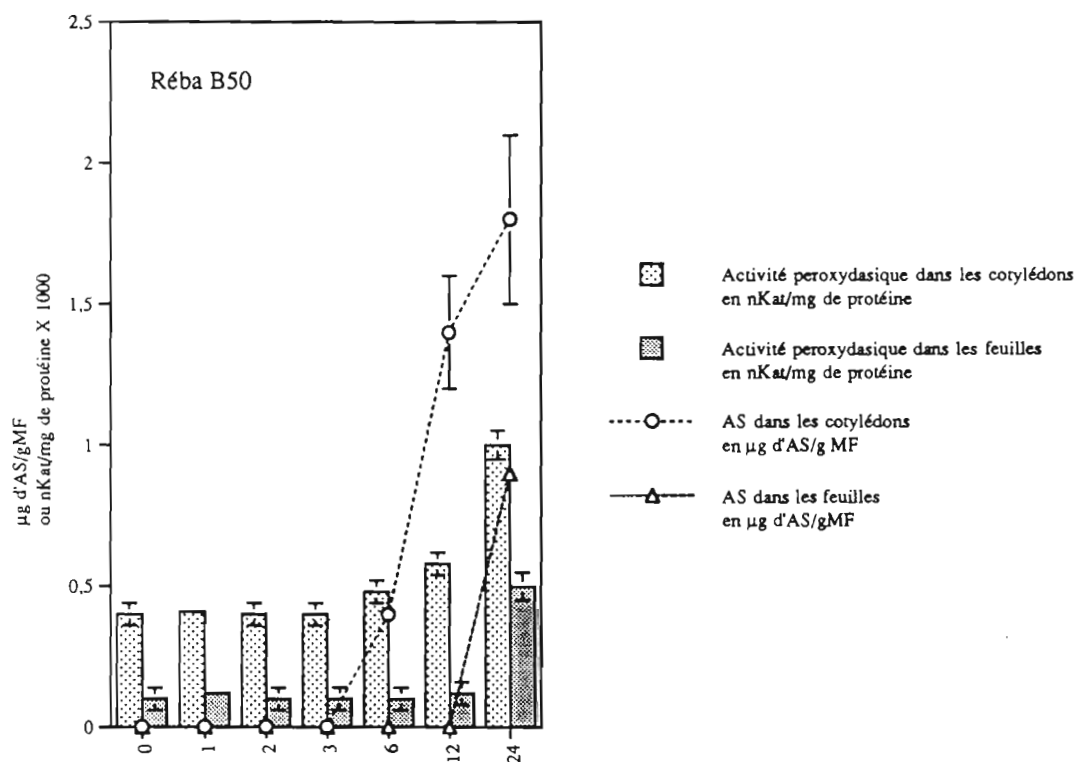
Dans le cas de l'interaction incompatible (Réba B50/*Xcm* race 18), l'AS est détecté dans les cotylédons à partir de 3h après l'inoculation, et dans les premières feuilles non inoculées si les cotylédons infectés demeurent solidaires de la plante au moins 3h après inoculation (Tableau 2). Au delà de 3h, l'ablation des cotylédons infectés n'influence plus l'évolution de la teneur en AS dans les feuilles (Tableau 2).

A ce temps, le taux d'AS est environ huit fois inférieur dans les cotylédons coupés, comparé à celui détecté dans les feuilles des mêmes plants 72h après inoculation.

3A



3B



Figures 3A et 3B: Effet de l'infiltration de H_2O_2 exogène sur l'activité peroxydasique et sur la teneur en AS dans les cotylédons et dans les feuilles:

Seuls les cotylédons sont infiltrés par H_2O_2 (200mM). A chaque temps, les cotylédons et les premières feuilles du rang supérieur sont prélevés simultanément. L'activité peroxydasique est testée sur les extraits de feuilles ou de cotylédons broyés, à température ambiante en utilisant le guaiacol comme substrat. L'analyse de la teneur en AS est effectuée par HPLC sur le liquide intercellulaire des cotylédons et des feuilles.

Les moyennes et les écart-types sont calculés d'après les résultats obtenus sur 10 individus.

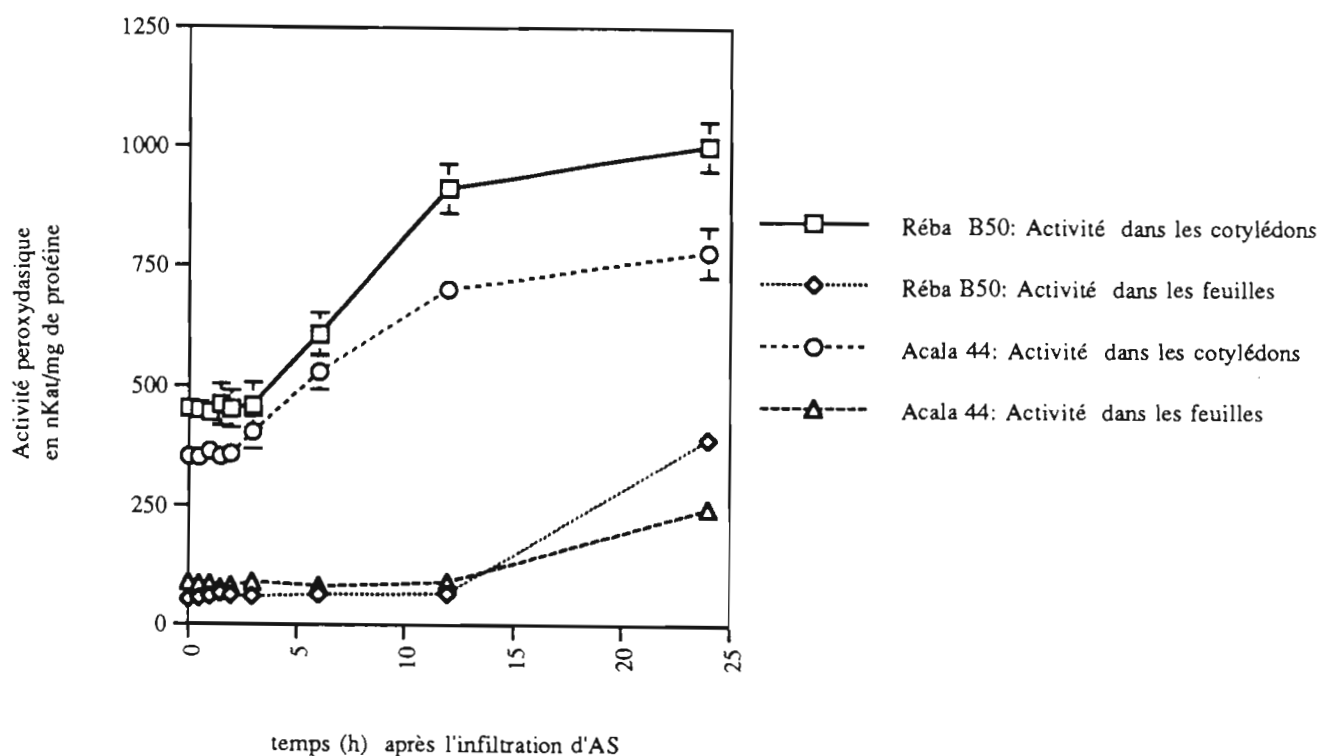


Figure 4: Effet de l'AS exogène sur l'induction des peroxydases.

Seuls les cotylédons sont infiltrés par l'AS (2mM). A chaque temps, les cotylédons et les premières feuilles du rang supérieur sont prélevés simultanément. L'activité peroxydasique est testée sur les extraits de feuilles ou de cotylédons broyés, à température ambiante en utilisant le guaiacol comme substrat. Les moyennes et les écart-types sont calculés d'après les résultats obtenus sur 10 individus.

Parallèlement au dosage de l'AS, l'activité peroxydasique a été mesurée dans les feuilles non inoculées. Le tableau 2 rapporte que l'augmentation de cette activité a lieu si l'ablation du cotylédon est effectuée au-delà de 3h après l'infection.

La même expérience est effectuée sur les cotylédons de la variété Réba B50 inoculée par *Xcm* race 20 (Tableau 3). On n'observe aucune augmentation d'AS dans les cotylédons ou dans les feuilles. L'augmentation significative d'activité peroxydasique dans les feuilles n'a lieu, quant à elle, que si les cotylédons infectés restent solidaires de la plante au moins 48h après inoculation (Tableau 3).

IV- Effet de H₂O₂ sur la concentration en acide salicylique (AS) et l'activité peroxydasique

Une gamme de concentration de H₂O₂ a été testée (non montré), et l'infiltration de 200mM de H₂O₂ permet d'obtenir une réponse significative de tous les plants. En effet, l'infiltration de H₂O₂ (200mM) dans les cotylédons provoque une accumulation d'AS détectée entre 3h et 6h après l'infiltration dans les cotylédons et entre 12h et 24h dans les feuilles de la variété Réba B50 et Acala 44 (Figures 3A et 3B). L'infiltration de H₂O₂ provoque une augmentation d'activité peroxydasique entre 3h et 6h après l'infiltration dans les cotylédons, et entre 12h et 24h plus tard dans les feuilles.

L'IEF réalisée après les infiltrations révèle que l'augmentation d'activité peroxydasique est due en particulier à l'activation des 2 isoformes P1 et P2 dans les cotylédons et à l'activation des cinq isoformes dans les feuilles (non montré).

V- Effet de l'AS exogène sur l'activité des peroxydases

Une gamme de concentration en AS a été testée (non montré), et l'infiltration de 2mM permet d'obtenir une réponse significative de tous les plants. En effet, l'infiltration d'AS (2mM) dans les cotylédons induit une augmentation d'activité peroxydasique dans les cotylédons entre 3h et 6h après l'infiltration et entre 12h et 24h dans les feuilles des deux variétés de cotonnier (Figure 4).

L'IEF réalisée après les infiltrations révèle que l'augmentation d'activité peroxydasique est due en particulier à l'activation des 2 isoformes P1 et P2 dans les cotylédons et à l'activation des cinq isoformes acides dans les feuilles.

Tableau 4 : Autofluorescence et détection des flavonoïdes et sesquiterpènes dans les cotylédons de cotonniers infectés par Xcm race 18

Réactif	Spécificité	Cultivar (a)	Reactivité en fonction du temps de l'infection (heures) après infiltration (b)											Sites de réaction (c)
			0	2	4	5	6	9	10	15	24	48		
Autofluorescence	Phénols ou terpènes naphthols (jaune-vert)	R	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
		S	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	A
Neu	Flavonoïdes (jaune-orangé) (d)	R	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	B
		S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B
Wilson	Flavonoïdes (jaune)	R	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	B
		S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B
Chlorure d'antimoine	sesquiterpènes aldéhydes (rouge)	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	C
		S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C

a : R = Reba B50, résistant; S = Acala 44, sensible.

b : - = pas de réponse; ± = réponse faible ; + = réponse forte.

c : A : autofluorescence jaune verte dans la zone infiltrée. A 4 heures, une forte fluorescence est visible à la marge la zone infiltrée dans la variété résistante.

B : fluorescence jaune observée d'abord dans les cellules de la marge de la nécrose, puis dans les cellules centrales de la nécrose chez la variété résistante.

C : les terpènes sont détectés dans la zone nécrotique de la variété résistante.

d : les flavonoïdes apparaissent jaune ou jaune brillant sous UV (365 nm) ou sous lumière bleue (420 nm), respectivement.

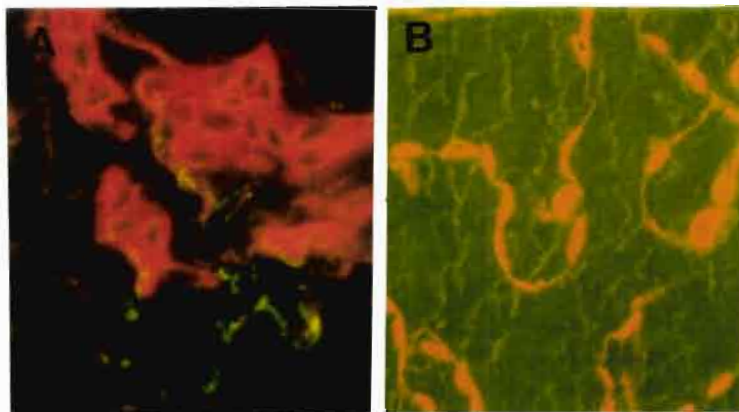


Figure 5 : Immunolocalisation des β -1,3 glucanes dans les zones de cotylédons de la variété résistante infiltrées avec la race 18 de Xcm (A) ou de l'eau (B). La fluorescence verdâtre traduit la présence de callose localisée uniquement dans les lésions nécrotiques (A) et pas dans les portions infiltrées avec de l'eau (B). (A et B : x 3000).

VI- Analyse microscopique

Bien que l'ensemble des résultats soit reporté dans l'article de Daï et al., (1996), un court descriptif permettra de mieux appréhender la localisation du produit de certains gènes au cours de l'infection. Le tableau 4 fait apparaître les principales données acquises concernant cette approche cellulaire.

1 - *Histochimie des composés phénoliques*

La recherche de composés du groupe des flavonoïdes s'est avérée positive en réponse à l'infection, à l'inverse des autres molécules phénoliques testées histochimiquement. Dans les plants résistants, ces composés s'accumulent dès neuf heures après l'inoculation des cotylédons par *Xcm* race 18 et ce dans les zones infiltrées uniquement. Aucune présence de telles molécules n'a été détectée dans les plants sensibles infectés, ni dans les cotylédons issus des motifs contrôles, infiltrés avec de l'eau.

2 - *Histochimie des composés terpéniques*

La couleur rouge, typique des sesquiterpènes aldéhydes en présence de chlorure d'antimoine, est visible dans les zones infiltrées des cotylédons résistants 48h après inoculation. Aucune coloration similaire n'a été détectée dans les plants sensibles infectés, ni dans les cotylédons issus des motifs contrôles, infiltrés avec de l'eau.

3 - *Immunolocalisation de la callose*

Après traitement du matériel végétal infecté ou non, la callose apparaît verte lorsque les coupes sont observées en épifluorescence verte (Figure 5). De nombreux dépôts de callose ont été observés 9h après inoculation dans les zones nécrotiques principalement en bordure des lésions. A l'exception de la callose présente dans les tubes criblés du phloème des plantes saines ou infectées, aucune fluorescence n'a été observée dans les plants sensibles.

DISCUSSION

I- Induction de gènes de défense

Les travaux exposés dans les deux chapitres précédents ont montré que l'inoculation des cotylédons de la variété Réba B50 par *Xcm* race 18 induit l'augmentation significative de l'activité de peroxydases anioniques mesurée dès dix heures après l'infection dans les zones infiltrées évoluant en lésions hypersensibles. L'un des rôles majeurs attribués aux peroxydases dans les processus de résistance est leur participation à la dernière étape de la synthèse des lignines dans les parois cellulaires. Cependant, dans le système cotonnier-*Xcm*, nous avons démontré que les tissus cotylédonnaires de la variété Reba B50 ne contenaient pas de lignine "de type réactionnelle" à un taux détectable autour, et dans, les lésions nécrotiques hypersensibles après l'inoculation par *Xcm* race 18 (Daï et al., 1996). L'absence de lignine dans les zones nécrotiques de type hypersensible, en réponse à un microorganisme infectieux, n'est pas exceptionnelle; elle a d'ailleurs été démontrée, entre autre, chez *Solanum dulcamara* résistant à *Aceria cladophytirius* (Bronner et al., 1991). Ces peroxydases acides des cotylédons n'étant pas impliquées dans un mécanisme de lignification, on peut s'interroger sur leur rôle potentiel dans la défense et/ou la résistance du cotonnier à la bactériose. Il a été démontré qu'en réponse à un agent pathogène, les peroxydases peuvent également oxyder un grand nombre de composés phénoliques qui acquièrent alors des propriétés antimicrobiennes (Kobayashi et al., 1994). Venere (1980) et Hunter (1972) rapportent que les peroxydases de cotonniers utilisent *in vitro* la catéchine, phénol majoritaire chez le cotonnier (Veech, 1976); ils observent que la catéchine oxydée réduit de 90% la viabilité des bactéries. Dans notre étude, aucune modification de la teneur en catéchine dans les cotylédons de la variété Réba B50 n'a été détectée *in planta* par histochimie après inoculation avec *Xcm* race 18 (Daï et al., 1996). Nos observations microscopiques nous permettent cependant de suggérer que les peroxydases pourraient être impliquées dans l'incorporation de flavonoïdes dans les parois des cellules concernées par la RH; une activité peroxydasique a d'ailleurs été localisée histochimiquement dans les parois de ces cellules des lésions

nécrotiques à partir de six heures post-inoculation. Les rôles antioxydants et antimicrobiens des flavonoïdes seraient déterminants dans la limitation (1) des processus d'oxydation liés à la RH et/ou (2) de la contamination bactérienne aux tissus adjacents.

Une analyse moléculaire actuellement en cours tend à démontrer que l'augmentation de l'activité des peroxydases acides cotylédonnaires suite à l'infection résulterait d'une néosynthèse de protéines.

Outre l'activation des gènes codant pour des peroxydases et des enzymes de la voie des flavonoïdes, et dont les produits de l'expression ont été visualisés dans les lésions de type hypersensible, d'autres gènes de défense sont activés parallèlement à la différenciation de la RH. En effet, quarante-huit heures suivant l'inoculation, l'accumulation de sesquiterpènes est visible au sein des lésions nécrotiques. Ces molécules, identifiées comme des phytoalexines par Essenberg et Pierce (1994), sont synthétisées vingt heures après infection, comme en témoigne l'accumulation des ARNm de la sesquiterpène cyclase (Gorski et al., 1995). L'ensemble flavonoïdes plus terpènes un arsenal puissant pour limiter la multiplication du parasite, auquel est associé le renforcement des parois par des dépôts de callose dans les espaces paramuraux.

II- L'activité peroxydase : un marqueur de la résistance systémique (SAR) chez le cotonnier ?

La SAR a été étudiée chez de nombreux modèles, comme le concombre inoculé par *Colletotrichum lagenarium* (Kuc, 1982; Smith et Hammerschmidt, 1988), la tomate infectée par *Phytophthora infestans* (Enkerli et al., 1993) ou encore le tabac inoculé par le TNV (Tobacco Necrosis Virus) (Bowles et al., 1990; Ward et al., 1991). Généralement, les auteurs associent la SAR à la formation de papilles (apposition de lignine, callose et/ou cellulose), ainsi qu'à une synthèse de protéines riches en glycine et de PR protéines dans les organes non infectés (Ryals et al., 1994; Kessmann et al., 1994; Sticher et al., 1997). En ce qui concerne les PR protéines, Ward et al. (1991), ont démontré que neuf familles de gènes sont induites dans les organes de tabac inoculés par le TNV. Ces gènes codent pour des β -1,3-glucanases, des chitinases et des protéines de type thaumatine. Dans notre cas, l'augmentation d'activité peroxydasique dans les feuilles non inoculées n'est pas associée, *a priori*, à l'apparition de nouvelles isoformes, mais à l'augmentation globale de l'activité de cinq isoformes acides pré-existantes,

excluant leur appartenance au groupe des PR protéines. A l'inverse, Rasmussen et al. (1995) rapportent qu'une peroxydase de 33kDa est induite lors de la SAR chez le concombre. Il démontre l'accumulation d'ARNm de peroxydase dix-huit heures après inoculation par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* et indique que le signal induisant cette expression est mobilisé hors de la feuille inoculée dans les quatre heures suivant l'inoculation. Dans le système cotonnier-*Xcm*, l'augmentation systémique d'activité peroxydase peut résulter soit d'une synthèse accrue de ces peroxydases, soit d'une régulation post-transcriptionnelle de ces isoenzymes; aucune donnée ne nous permet de trancher actuellement en faveur de l'une ou l'autre hypothèse.

Bien que plus faible, une augmentation d'activité peroxydasique a également été observée dans les feuilles de cotonnier après inoculation par *Xcm* dans le cas de l'interaction compatible Réba B50/*Xcm* race 20. Enkerli et al., (1993) ont observé un phénomène similaire de déclenchement de la SAR chez des plants de tomate sensible à *P. infestans*. Kuc (1982) a rapporté que la première étape dans le développement de la SAR est la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante, même si elle ne repose pas sur une relation de type gène pour gène. De nombreux travaux rapportent cependant l'association de la SAR avec l'installation de la RH, établissant une corrélation entre le niveau de protection des organes non infectés, l'amplitude des lésions nécrotiques et le type d'agent pathogène (Madamanchi et Kuc, 1991). Cette protection repose sur l'émission de signaux impliqués dans l'activation de gènes de défense dans les tissus et organes adjacents (Ryals et al., 1994). Chez le cotonnier, l'inoculation des cotylédons des deux variétés par *Xcm*, puis des feuilles soixante-douze heures plus tard par la même souche bactérienne, conduit à une réduction significative du nombre de bactéries, démontrant l'existence d'une protection de ces feuilles contre cette surinfection. Si l'on compare les résultats obtenus dans le chapitre 1 (tableau 1) et les résultats obtenus dans ce chapitre (tableau 1), on remarque que le niveau de protection tend à être proportionnel au niveau d'activité peroxydasique, suggérant que l'augmentation de cette activité est une composante de la SAR.

III- Le rôle de l'Acide Salicylique (AS) dans la résistance systémique (SAR)

Chez le cotonnier, l'AS semble jouer un rôle primordial dans les mécanismes de résistance et de défense contre l'attaque par *Xcm*. En effet, dans le

cas de la réaction incompatible (Réba B50/*Xcm* race 18), un pic de production d'AS est tout d'abord détecté aux alentours de six heures dans les cotylédons infectés qui réagissent par une RH, puis une nouvelle augmentation d'AS est observée dans les cotylédons et parallèlement dans les feuilles supérieures non inoculées à partir de douze heures après infection. Il est généralement admis que l'AS sert de signal majeur ou intervient dans le déclenchement des signaux systémiques secondaires pouvant induire la SAR à travers la plante (Madamanchi et Kuc, 1991; Rasmussen et al., 1991; Raskin, 1992; Gaffney et al., 1993; Sticher et al., 1997). En accord avec ce principe, l'infiltration d'AS exogène dans les cotylédons de cotonnier des deux variétés provoque une augmentation d'activité peroxydasique douze heures plus tard et dans les feuilles vingt-quatre heures après l'infiltration. Ces augmentations d'activité correspondent à la stimulation des isoformes P1 et P2 dans les cotylédons et à celle de l'ensemble des cinq isoenzymes dans les feuilles, déjà observées après infection par *Xcm*.

A partir des résultats acquis par la technique d'ablation des cotylédons, il est légitime de penser que le signal induisant l'augmentation d'activité peroxydasique dans les feuilles non inoculées est généré dans les trois heures après l'infection par *Xcm*. En tout état de cause, nos expériences montrent que pour notre modèle, le temps "3 heures" constitue un point de non-retour au-delà duquel le signal ayant diffusé hors du cotylédon inoculé, l'élimination du site de production du signal ne modifie plus le cours des événements. Il est intéressant de noter que la production de ce signal est bien liée à une reconnaissance du parasite par la plante, puisque le traumatisme abiotique ne produit pas d'effet, ni la relation compatible. L'excision des cotylédons à divers temps après l'inoculation nous indique que l'AS n'est induit dans les feuilles que si elle intervient au moins trois heures après l'inoculation. Ces observations suggèrent que la première production d'AS est le signal qui est à l'origine de l'augmentation systémique de l'activité peroxydasique chez le cotonnier. Bien que le taux d'AS, trois heures après l'inoculation, soit à un niveau à peine détectable dans les cotylédons détachés de la plante, soixante-douze heures plus tard le taux d'AS des feuilles est similaire à celui des feuilles de plantes qui n'ont pas subi l'ablation des cotylédons inoculés. Le transport éventuel de l'AS du site de production, proche du site d'infection, à l'ensemble de la plante a été longtemps l'un des mécanismes envisagés pour expliquer le déclenchement à distance des gènes de défense à l'échelle systémique (Malamy et al. 1990;

Madamanchi et Kuc, 1991). Mais plusieurs auteurs (Rasmussen et al., 1991; Vernnoij et al., 1994) ont démontré que l'AS n'était qu'un signal primaire impliqué dans l'élicitation, d'autres signaux agissant à longue distance. Dès lors, si dans le cotonnier l'AS était le signal systémique véhiculé dans la plante à partir des cotylédons, les taux détectables d'AS dans les cotylédons de cotonnier - source présumée de la formation de l'AS - ne devraient pas être dix fois inférieur lors de leur ablation à celui détecté dans les feuilles quarante-huit heures après l'inoculation. Ceci tend à démontrer que dans le cotonnier, l'AS libre ne diffuse pas à l'ensemble de la plante à partir des cotylédons, mais qu'il ne peut s'agir que d'un autre signal ayant pour effet d'induire la production d'AS foliaire ce qui implique probablement une activation de la biosynthèse des enzymes de la voie métabolique conduisant à la synthèse d'AS. Mentionnons à cet égard que l'activité peroxydasique systémique n'apparaît dans les feuilles non inoculées que si l'AS foliaire est produit.

De nombreux travaux rapportent que l'AS existe sous forme conjuguée au glucose (acide β -glucosyl salicylique) (Enyedi et al., 1992; Chen et al., 1995). Lors d'interactions incompatibles, cette forme conjuguée a été localisée dans les cellules voisines des lésions nécrotiques, et n'a pas été détectée dans le phloème, ni dans les feuilles non infectées (Enyedi et al., 1992). Un grand nombre d'auteurs ont démontré que l'AS glycosylé est une forme inactive de stockage de l'AS (Chen et al., 1995; Ryals et al., 1996; Durner et al., 1997). Pour cette raison, seul l'AS libre a été dosé au cours de notre étude sur la SAR induite chez le cotonnier par *Xcm*, puisque l'on s'intéresse ici au "messager" actif de la SAR. Par ailleurs, Enyedi et al., (1992) rapportent que l'AS conjugué au glucose est une forme très peu mobile dans le phloème, suggérant que l'AS libre est la forme transportée. Cependant, nos travaux démontrent que l'AS libre n'est pas le signal transloqué des organes infectés vers l'ensemble de la plante. Enfin, récemment, Shulaev et al., (1995) suggèrent que le signal mobile recherché pourrait être le méthyl-salicylate. A température ambiante, le méthyl-salicylate est sous forme liquide et pourrait être transporté à travers le système vasculaire de la plante, puis être reconverti en AS libre pour activer les gènes de défense. Dans notre étude, la forme méthylée de l'AS n'a pas été dosée, il conviendrait donc d'effectuer des recherches en ce sens dans le futur.

IV- Acide Salicylique et burst oxydatif dans la réaction hypersensible

Aux alentours de six heures après l'infection, le premier pic de production d'AS, détecté uniquement dans les cotylédons de la variété résistante inoculée par *Xcm* race 18, est précédé par le burst oxydatif produit trois heures après l'infection. Il apparaît alors intéressant de suggérer une relation possible entre la production des formes réactives de l'oxygène et celle de l'AS. A cet égard, l'infiltration de peroxyde d'hydrogène dans les cotylédons de cotonnier induit une accumulation d'AS, six heures après inoculation. Plusieurs auteurs décrivent les relations possibles entre l'AS, la production de formes réactives de l'oxygène et la RH (Chen et al., 1993; Léon et al., 1995; Ryals et al., 1996). Ces derniers ont rapporté que l'infiltration de peroxyde d'hydrogène à des feuilles de tabac provoque - comme dans notre système - une augmentation d'AS, mais également d'acide benzoïque, précurseur de l'AS, ainsi que l'induction d'une hydroxylase qui catalyse la conversion de l'acide benzoïque en AS.

Ainsi, l'ordre des événements dans les cotylédons de cotonniers résistants inoculés par *Xcm* et les réponses associées aux traitements de peroxyde d'hydrogène ou AS suggèrent l'enchaînement des étapes suivantes au cours de l'interaction incompatible (Figure 6) :

1. après une reconnaissance spécifique entre le cotonnier résistant (Réba B50) et la race 18 avirulente de *Xcm*, il se produit un burst oxydatif déclenché trois heures après l'infection et caractérisé par une production accrue d'anions superoxydes générée par une peroxydase (qui oxyde le NADH) dans les cotylédons infectés;

2. l'anion superoxyde très instable serait rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène.

3. le peroxyde d'hydrogène induirait une production d'AS localisée dans les cotylédons, dès trois heures après infection, avec un maximum six heures suivant l'infiltration. Plusieurs gènes de défense seraient alors exprimés entre neuf et vingt-quatre heures suivant l'infection; les produits de certaines voies métaboliques ainsi stimulées ont été identifiés au sein des lésions nécrotiques - flavonoïdes, activité de peroxydases acides et phytoalexines.

Les cellules concernées par la RH pourraient être la source de molécules signales, régulatrices de ces réactions de défense exprimées au site d'infection. L'expression de ces gènes de défense dans les - ou proches des - cellules de la RH contribuerait à une immunité localisée contre une infection ultérieure. Ce

comportement a été dénommé résistance locale acquise (LAR) par Ross dès 1961. A ce titre, et tout récemment, Dorey et al. (1997) ont analysé l'expression spatio-temporelle de gènes de défense du tabac dans le cas d'une RH induite par un éliciteur fongique. Ces auteurs ont montré que l'activation de ces gènes - PR protéines, enzymes de bioynthèse de composés phénoliques... - dans les cellules localisées autour du siège la RH, dépendaient de la transmission d'un signal de cellule à cellule gouvernée par l'AS.

4. Un autre signal, dont la nature reste à déterminer, émis dans les cotylédons trois heures post-inoculation provoque une accumulation d'AS, plus tardive mais plus importante, à la fois dans les cotylédons et dans les feuilles. Etant donné que l'infiltration de peroxyde d'hydrogène dans les cotylédons provoque également une augmentation systémique d'AS dans les feuilles, il est légitime de penser que le peroxyde d'hydrogène, produit lors du burst oxydatif, pourrait être ce signal émis dès trois heures après l'inoculation induisant la SAR. Dès 1994, Levine et al. ont démontré le rôle clef du peroxyde d'hydrogène dans la gestion de la réaction hypersensible, incluant l'activation de la mort cellulaire et le contrôle de l'activation des gènes de défense impliqués dans la LAR.

A l'opposé de ce schéma, des travaux ont rapporté que la production d'AS était antérieure au burst oxydatif et à la mort cellulaire (Kauss et Jeblick, 1996; Shirasu, 1997). Des mesures d'AS ont révélé que cette molécule s'accumule chez le tabac entre une et deux heures après l'inoculation par *P. syringae* pv. *phaseolicola* juste avant le burst oxydatif (Draper, 1997). Selon Bi et al., (1995), l'AS serait lié à une catalase dont l'activité serait inhibée à des concentrations d'AS supérieures à 250 μ M, provoquant ainsi une accumulation de peroxyde d'hydrogène qui servirait de messenger secondaire dans le déclenchement des gènes de défense (Chen et al., 1993).

Cette analyse révèle que le(s) rôle(s) précis de l'AS dans la résistance des plantes est encore mal défini, voire controversé. Nos expériences menées sur le couple cotonnier/*Xanthomonas* indiquent cependant que l'AS tiendrait une place prépondérante dans la résistance à la bactériose, mais en tant que messenger secondaire dont la synthèse serait élicitée par une forme réactive de l'oxygène. En effet, la recherche de production d'AS dans les cotylédons avant la troisième heure consécutive à l'infection s'est avérée négative.

Tableau 5 : récapitulatif des critères de résistance dans les différents systèmes cotonnier - Xanthomonas

Interactions	RH (1)	Burst oxydatif		Production AS (3)	SAR (4)	Délai d'émission d'un signal (5)	Infiltration	
		Xcm	éliciteurs (2)				H2O2 (6)	AS (7)
Incompatible								
Réba B50/Xcm 18	+	+	+	+	+	3	+AS	+Pox
Compatible								
Réba B50/Xcm 20	-	-	+	-	+	24-48	+AS	+Pox
Acala 44/Xcm 18	-	-	+	-	±	-	+AS	+Pox

(1) : réaction hypersensible caractérisée par le phénotype "lésions nécrotiques" sur les cotylédons infiltrés

(2) : injection d'éliciteurs (digitonine, Mn Cl₂, 2,4D) déclenchant la production de formes réactives de l'oxygène

(3) : acide salicylique produit après infection par Xcm

(4) : résistance systémique mesurée par l'augmentation d'activité peroxydase dans les feuilles non inoculées

(5) : délai d'émission d'un signal, exprimé en heures après l'infection des cotylédons, et caractérisé par la mesure de l'activité peroxydase dans les feuilles non inoculées

(6) : effet de l'infiltration d'H₂O₂ sur la production d'AS dans les cotylédons et les feuilles

(7) : effet de l'infiltration d'acide salicylique sur l'activité peroxydasique dans les cotylédons et les feuilles

V- Reflexions sur le système gène - pour - gène dans l'interaction cotonnier/*Xanthomonas*

Le tableau 5 regroupe les principaux résultats acquis au cours de cette analyse différentielle sur la résistance du cotonnier à la bactériose. Dans le système cotonnier-*Xcm*, les mécanismes d'induction des activités peroxydases dans les organes non infectés durant la réaction incompatible semblent différents de ceux opérant au cours de la réaction compatible. En effet, après ablation des cotylédons, le signal associé à l'induction systémique de l'activité peroxydasique est émis tardivement, entre vingt quatre et quarante huit heures après inoculation, lors de l'interaction compatible Réba B50/*Xcm* race 20, sans accumulation détectable d'AS suggérant la participation d'autres signaux. En revanche chez le couple compatible Acala 44/*Xcm* race 18, cette variété sensible semble capable de répondre par une synthèse d'AS après infiltration de peroxyde d'hydrogène et par une augmentation d'activité peroxydasique après infiltration d'AS. Nous avons également démontré que la variété Acala 44, incapable de déclencher le burst oxydatif après l'infection par *Xcm*, était capable de produire de l'anion superoxyde en quantité équivalente sous l'action d'éliciteurs abiotiques. Ces résultats

(1) indiquent que le contournement de la résistance de la variété Réba B50 par la race 20 favorise une relative sensibilité de cette variété dont les mécanismes paraissent différents de ceux impliqués au cours de la compatibilité du couple Acala 44/*Xcm* race 18 ,

(2) confirment que la résistance du cotonnier est étroitement dépendante de l'interaction gène - pour - gène (De Feyter et al., 1992) et

(3) suggèrent que les fondements moléculaires à l'origine de ce contournement de la résistance intéresseraient des modifications du complexe de gènes bactériens *avr/pth/hrp* qui serait ainsi à l'origine d'une défaillance dans l'interaction gène - pour - gène du couple Réba B50/*Xcm* race 20.

La fonction des produits des gènes d'avirulence et la nature des molécules signales reconnues par la plante sont restées un mystère depuis de longues années. Récemment, plusieurs équipes ont montré que des protéines codées par les gènes d'avirulence d'origine bactérienne fonctionneraient comme des éliciteurs perçus à l'intérieur des cellules de la plante (Arlat et al., 1994; Bonas et Ackerveken, 1997). En outre, le produit des gènes *hrp* (pour HR et pathogenicity),

essentiels pour l'établissement de la RH (He, 1996), aurait un rôle déterminant dans le système de sécrétion dont la fonction serait d'injecter le(s) produit(s) des gènes bactériens dans la cellule hôte, démontrant l'association étroite de ces gènes dans l'initiation de la résistance. Bonas et Ackerveken (1997) ont récemment suggéré que le système de sécrétion formerait un tunnel au travers des membranes de la bactérie, de la paroi cellulaire et du plasmalemme des cellules végétales. Après injection de la protéine Avr, celle-ci serait alors reconnue par les produits du gène de résistance de la plante. La reconnaissance peut avoir lieu dans le cytoplasme, ou le noyau.

A la lumière de ces travaux récents, et au vu de nos résultats, on peut dès lors s'interroger sur les mécanismes impliqués lors de l'interaction compatible Réba B50/*Xcm* race 20. En effet, au cours de cette interaction,

- aucun burst oxydatif n'est observé,
- aucune RH n'est déclenchée,
- et l'AS ne s'accumule ni dans les cotylédons ni dans les feuilles,
- pourtant, une augmentation significative d'activité peroxydasique est détectée dans les cotylédons et dans les feuilles.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

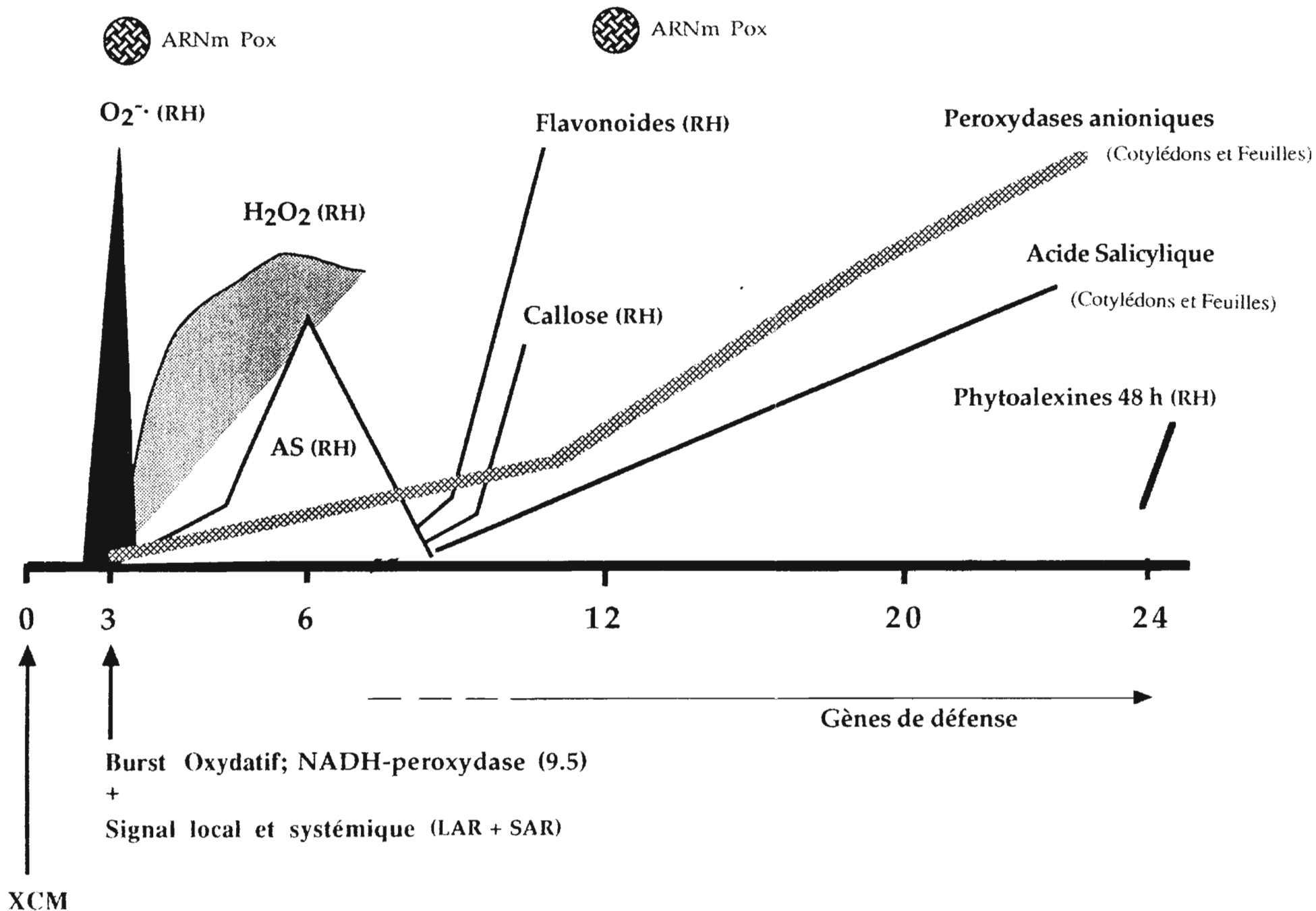


Figure 1: Résumé des principaux résultats obtenus et décrits dans les trois chapitres précédents.

Les objectifs de ce travail étaient (1) d'identifier et de caractériser des peroxydases de cotonnier susceptibles d'être associées à la résistance à la bactériose causée par *Xcm* et (2) de leur attribuer une fonction dans la stratégie de défense contre la maladie. Les principaux résultats acquis ouvrent plusieurs voies de recherches qui, à mon sens, mériteraient d'être approfondies.

I- Les peroxydases cationiques

Les travaux décrits dans ce mémoire ont permis de démontrer l'existence d'une peroxydase NADH-dépendante constitutive génératrice d'anions superoxydes lors de l'interaction incompatible entre le cotonnier et *Xcm*, malgré la présence d'une NADPH-oxydase membranaire connue, par ailleurs, pour également produire des formes réactives de l'oxygène. Nos résultats montrent que cette production a lieu trois heures après l'inoculation. A ce même temps, une augmentation d'activité d'une peroxydase cationique (P7) a été visualisée grâce au substrat guaiacol sur gel d'IEF, mais non dosable spectrophotométriquement. Aussi pourrait-on suggérer que cette protéine possède deux sites actifs : l'un de type NADH-oxydase producteur d'anions superoxydes, l'autre consommateur de H_2O_2 . Cette dualité fonctionnelle est à rapprocher de celle de protéines de bactéries lactiques possédant deux sites enzymatiques différents, l'un à activité NADH oxydase et l'autre à NADH peroxydase, jouant un rôle dans l'équilibre du potentiel d'oxydoréduction intracellulaire (Sakamoto et al., 1996).

Des résultats obtenus tout récemment montrent que les éliciteurs de l'activité NADH-oxydase ($MnCl_2$ et 2,4-dichlorophénol) n'ont pas d'effet sur l'activité guaiacol-peroxydase. Or, trois heures après l'inoculation, dans le cadre de l'incompatibilité, on observe une augmentation d'activité guaiacol-peroxydasique sur gel d'IEF ce qui (1) indique que les deux sites actifs sont régulés indépendamment par des activateurs/inhibiteurs différents et (2) suggère une régulation transcriptionnelle différente. Dans ce sens, l'analyse moléculaire d'ARNm a permis de mettre en évidence une augmentation d'ARNm de peroxydase entre deux heures et trois heures après l'inoculation.

L'infiltration de peroxyde d'hydrogène dans les cotylédons de cotonnier

induit une accumulation d'AS et une augmentation d'activité peroxydasique, à la fois chez la variété résistante et la variété sensible qui ne possède pas de gènes de résistance. Jabs et al. (1996) ont décrit plusieurs mutants d'*Arabidopsis* qui ne manifestent pas de lésions nécrotiques lors d'une interaction incompatible. Chez de telles plantes, l'application de peroxyde d'hydrogène est alors nécessaire, et suffisante, pour rétablir le processus de nécrotisation. D'après nos résultats et ceux de la littérature, tout semble alors indiquer que la production de formes réactives de l'oxygène est un mécanisme clef, voire essentiel, à la formation des nécroses. Si tel est le cas, la peroxydase NADH-dépendante de cotonnier pourrait tenir une place de choix dans la mise en place de la RH. Dans cette optique, nos travaux constituent une base intéressante pouvant aboutir au clonage du (ou des) gène(s) codant pour cette peroxydase dans une éventuelle perspective de mise au point de plantes transgéniques.

II- Les peroxydases anioniques

Parallèlement, nous avons pu mettre en évidence l'existence de cinq isoformes anioniques dans les cotylédons des deux variétés Réba B50 et Acala 44. En réponse à une infection par *Xcm*, aucune isoforme nouvelle ne semble apparaître dans le cadre de la compatibilité ou de l'incompatibilité. En revanche, une augmentation de l'activité des seules isoformes P1 et P2 a été observée au cours de l'interaction incompatible. L'analyse des ARNm nous permet de penser à la possibilité d'une régulation transcriptionnelle, même si ces résultats ne contredisent pas l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle simultanée. Il serait dès lors intéressant de déterminer si les cinq isoenzymes anioniques sont effectivement le produit de plusieurs gènes, et d'étudier les modalités de leur régulation au cours de l'infection. Dans ce sens, Chittoor et al., (1997) rapportent que trois gènes codant pour des peroxydases sont associées à la résistance du riz à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Leurs résultats démontrent que les différents gènes sont régulés de façon distincte en réponse à des conditions environnementales variées.

III- La peroxydation des lipides

On suggère que la peroxydation des lipides est un mécanisme important de la RH; c'est considéré comme l'une des étapes intermédiaires entre la production des formes réactives de l'oxygène et la mort cellulaire (voir Figure 11, chapitre 2).

L'une des actions des formes réactives de l'oxygène conduit à la déstructuration des systèmes membranaires par peroxydation des lipides dont les produits de dégradation ont été suggérés comme pouvant être impliqués dans l'activation de gènes de défense. Dans le cas du cotonnier résistant à *Xcm* race 18, $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 sont produits dans le compartiment apoplastique respectivement par une peroxydase cationique et des superoxydismutases (non caractérisées dans notre étude). Si, par ailleurs, les produits de plusieurs gènes de défense ont été caractérisés dans le modèle cotonnier/*Xcm*, les mécanismes sous-jacents à l'activation de ces gènes ne sont pas connus. Il serait dès lors judicieux de mettre en évidence le rôle des formes réactives de l'oxygène produites par le cotonnier sur les systèmes membranaires en caractérisant les produits de dégradation des lipides membranaires et, éventuellement, d'en analyser l'impact sur les niveaux d'expression de certains gènes de défense.

IV- La mort cellulaire

Il n'est pas improbable que la production de formes réactives de l'oxygène et la mort cellulaire soient des phénomènes très liés lors de l'expression de la RH. Dans le cas de l'interaction incompatible entre le cotonnier et *Xcm*, le burst oxydatif est observé trois heures post-inoculation et la RH est détectée visuellement onze heures après inoculation. De nombreux travaux rapportent que la production de formes réactives de l'oxygène précède la mort cellulaire, à la fois dans le monde végétal et animal (Adam et al., 1989; Restérucchi et al., 1996, Tiedemann, 1997). La relation qui peut exister entre la mort cellulaire programmée dans le monde animal et le processus nécrotique associé à la RH chez les végétaux nourrit actuellement un débat très animé. Le phénomène d'apoptose et celui de la nécrose cellulaire observée lors de la RH ont longtemps été identifiés comme étant des types de mort cellulaire fondamentalement différents.

L'apoptose est responsable de la majorité des processus de mort cellulaire programmée lors d'évènements physiologiques ou pathologiques variés, comme la différenciation cellulaire, le modelage des tissus de l'embryon ou encore le renouvellement des cellules. Au plan morphologique, l'apoptose est caractérisée par une condensation nucléaire et cytoplasmique des cellules, suivie de la perte de la membrane nucléaire, de la fragmentation de la chromatine et de la formation de multiples fragments de matériel nucléaire et cytoplasmique (Buja et

al., 1993). Ces corps apoptotiques sont ensuite absorbés par les cellules adjacentes.

La nécrose des cellules végétales dans le cas de la RH est induite lors de l'agression par des microorganismes. Pour cette raison, la RH a été considérée pendant longtemps comme étant la résultante unique d'une réponse à la pénétration d'un microorganisme; cette conception la différenciait fondamentalement d'une mort cellulaire programmée. Au plan morphologique, l'une des caractéristiques de la RH est la rétraction du plasmalemme de la paroi et sa vésiculation, de même que l'apparition d'agrégats de microfibrilles et de vésicules dans l'espace périplasmique. A notre connaissance, la formation de corps apoptotiques au cours de la RH n'a pas encore été caractérisée. De plus, la présence d'une paroi végétale s'oppose au "trafic apoptotique" observé dans les cellules animales.

La pertinence d'une distinction entre deux types de mort cellulaire l'une chez la cellule animale et l'autre chez la cellule végétale tend alors à s'effondrer lorsque la littérature rapporte que des mutants d'*A. thaliana* sont capables de manifester des lésions nécrotiques spontanément, en l'absence d'agents pathogènes (Jabs et al., 1996). De plus, Mittler et Lam (1997) ont démontré que chez le tabac inoculé par TMV, la nécrose est accompagnée d'une fragmentation de l'ADN par des endonucléases. Levine et al., (1996) ont rapporté que l'application de peroxyde d'hydrogène sur des suspensions cellulaires provoque une fragmentation de l'ADN, accompagnée de la condensation nucléaire et d'autres caractéristiques de l'apoptose. Récemment, certains gènes, comme *dad-1* inhibiteur de la mort cellulaire programmée, ont été simultanément isolés chez le riz et le hamster (Tanaka et al., 1997).

Chez le cotonnier, plusieurs caractéristiques ultrastructurales, se rapprochant de celles décrites pour l'apoptose, ont été observées : la condensation du cytoplasme et de la chromatine, la rétraction du plasmalemme et sa vésiculation. A l'inverse, la fragmentation du noyau n'a jamais été observée. L'analyse de la RH pourrait faire l'objet d'une attention spécifique concernant le comportement du noyau durant le processus de mort cellulaire déclenché lors de la résistance contre *Xcm*. Des actions de recherches pourraient se focaliser sur la fragmentation de l'ADN par une endonucléase potentielle et la formation de corps apoptotiques similaires ou non ceux décrits dans les tissus animaux.

V- La SAR

Nos résultats ont enfin démontré que les peroxydases sont impliquées dans les mécanismes de la SAR chez le cotonnier. En effet, après inoculation des cotylédons, on observe une augmentation d'activité de l'ensemble des cinq isoformes anioniques dans les feuilles. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'AS tenait une place importante dans les mécanismes de résistance et de SAR chez le cotonnier. En effet, dans le cas de l'interaction incompatible avec *Xcm*, l'apparition de l'AS libre est liée à la forte augmentation systémique d'activité peroxydasique. On a pu cependant observer le déclenchement d'une SAR dans le cadre d'une interaction compatible entre le cotonnier et *Xcm* en l'absence d'AS libre, suggérant la présence d'un autre signal impliqué dans le déclenchement de la SAR lorsqu'il n'y a pas résistance gène pour gène. L'acide jasmonique est connu pour jouer un rôle essentiel dans l'activation de gènes de défense induits de façon systémique. Une étude plus générale sur les molécules "signaux" induisant une réponse systémique de résistance comme la systémine, l'acide abscissique, ou encore l'éthylène, pourrait être envisagée.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAM, A., FARKAS, T., SOMLYAI, G., HEVESI, M. and KIRALY, Z. (1989) Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco : deterioration of membrane lipids. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 34, 13-26.
- ADAM, A.L., BESTWICK, C.S., BARNA, B. and MANSFIELD, J.W. (1995) Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Planta** 197, 240-249.
- ANDERSON, (1989) Membrane-derived fatty acids as precursors to second messengers. *In: Second Messengers in Plant Growth and development.* BOSS, W.F., MORRE, D.J. eds. New York. 6, 181-212.
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F. and LOW, P.S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology** 90, 109-116.
- ARLAT, M., VAN GISEGEM, F., HUET, J.C., PERNOLLET, J.C. and BOUCHER, C.A. (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. **EMBO Journal** 13, 543-553.
- ARNOLD, M.H. and BROWN, S.J. (1968) Variation in the host-parasite relationship of a crop disease. **Journal of Agricultural Science** 71, 19-36.
- ASKERLUND, P., LARSSON, C., WIDELL, S. and MOLLER I.M. (1987) NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. **Physiologia Plantarum** 71, 9-19.
- ATKINSON, G.F. (1891) The black rust of cotton. Alabama **Agricultural Experimental Station bulletin** 27, 1-16.
- AUH, C.K. and MURPHY, T.M. (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. **Plant Physiology** 107, 1241-1247.
- BAKER, C.J. and ORLANDY, E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology** 33, 299-321.
- BEFFA, R., MARTIN, H.V. and PILET, P.E. (1990) *In vitro* oxidation of indolacetic

- acid by soluble auxin-oxidases and peroxidases from maize roots. **Plant Physiology** 94, 485-491.
- BESTWICK, C.S., BROWN, I.R., BENNET, M.H.R. and MANSFIELD, J.W. (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **The Plant Cell** 9, 209-211.
- BHAGWAT, V.Y. and BHIDE, V.P. (1962) Vascular infection of some cottons by *Xanthomonas malvacearum*. **Indian Cotton Growing Review** 16, 80-83.
- BI, Y.M., KENTON, P., MUR, L., DARBY, R. and DRAPER J. (1995) Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR-protein expression. **The Plant Journal** 8, 235-245.
- BECKMAN, C.H. (1987) The nature of wilt diseases of plants. APS Press, St Paul, Minnesota.
- BOHER, B., BROWN, I., NICOLE, M., KPOMOUA, K., BONAS, U., GEIGER, J.P., 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.
- BOL, J.F., LINTHORST, H.G.M., and CORNELISSEN, B.J.C. (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology** 28, 113-138.
- BOLWELL, G.P., BUTT, V.S., DAVIES, D.I. and ZIMMERLIN, A. (1995) The origin of the oxidative burst in plants. **Free Radical Research** 11, 517-532.
- BONAS, U. and VAN DEN ACKERVEN, G. (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial disease? **The Plant Journal** 12, 1-7.
- BORCHERT, R. (1978) Simultaneous separation of acidic and basic isoperoxydases in wounded potato tissue by acrylamide gel electrophoresis. **Plant Physiology** 62, 794-797.
- BOWLES, D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. **Annual review of Biochemistry** 59, 873-907.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248-254.
- 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.
- BRONNER, R., WESTPTHAL, E. and DREGER, F. (1991) Enhanced peroxidase activity associated with the hypersensitive response of *Solanum dulcamara* to the gall mite *Aceria cladophthirus* (Acari: Eriophyoidea). **Canadian Journal of Botany** 69, 2192-2196.
- BROWN, S.J. (1976) Plant pathology. In: Agricultural Research For Development. ARNOLD, M.H. ed. Cambridge University Press, Cambridge, 151-173.
- BUFFARD, D., BREDI, C., VAN HUUSTEE, R.B., ASEMOTA, O., PIERRE, M., HA, D.B. and ESNAULT, R. (1990) molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 87, 8874-8878.
- BUJA, L.M., EIGENBRODT, M.L. and EIGENBRODT, E.H. (1993) Apoptosis and necrosis. basic types and mechanisms of cell death. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** 117, 1208-1214.
- BUONAURO, R. and MONTALBINI, P. (1995) Tobacco mosaic virus induced systemic changes in the isoperoxidase pattern in tobacco leaves and the relation to acquired resistance to powdery mildew infection. **Phytopathologia Mediterranea** 34, 184-191.
- CHEN, Z., SILVA, H. and KLESSIG, D. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science** 262, 1883-1886.
- CHEN, Z., MALAMY, J., HENNING, J., CONRATH, U., SANCHEZ-CASAS, P., SILVA, H., RICIGLIANO, J. and KLESSIG, D. (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. **Proceedings of the National Academy of Science, USA** 92, 4134-4137.
- CHITTOOR, M.C., LEACH, J.E. and WHITE, F.F. (1997) Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant-Microbe interactions** 10, 861-871.
- CRAIG, J.S., KERBY, K.B. STEIN, B.D. and SOMMERVILLE, S.C. (1995) Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 47, 407-418.

- CROSSE, J.E. (1963) Pathogenicity differences in Tanganyika populations on *Xanthomonas malvacearum*. **Empire Cotton Growing Review** 40,125-130.
- CURTIS, M.D., RAE, A.L., RUSU A.G., HARRISSON, S.J. and MANNERS J.M. (1997) A peroxidase gene promoter induced by phytopathogens and methyl jasmonate in transgenic plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 10, 326-338.
- CUTT, J.R. and KLESSIG, D.F. (1992) Pathogenesis-related proteins. *In: Genes involved in plant defense*. BOLLER, T. and MEINS, F. eds. Wien. 209-243.
- CZANINSKI, Y., SACHOT, R.M. and CATESSON, A.M. (1993) Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. **Annals of Botany** 72, 547-550.
- DAI, 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. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 49, 285-306.
- DANGL, J.L., DIETRICH, R. and RICHBERG, M.H. (1996) Death don't have no mercy : cell death programs in plant-microbe interactions. **The Plant Cell** 8, 1793-11807.
- DARIMONT, E. (1977) Les isoperoxydases de la racine de lentille. Leur variation en rapport avec l'interaction auxine-cytokinine sur la croissance. Thèse de doctorat, Université de Liège, 223p.
- 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.
- DE FEYTER, R., YANG, Y. and GABRIEL, D.W. (1992) Gene-for-gene interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* avr genes. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 6, 225-237.
- DEGOUSEE, N. TRIANTAPHYLIDES, C. and MONTILLET, J.L. (1994) Involvement of oxidative process in the signalling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). **Plant Physiology** 104, 945-952.
- DESIKAN, R., WOOD, L.G., 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 Letters** 382, 231-217.
- DEVLIN, W.S. and GUSTINE, D.L. (1992) Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. **Plant Physiology** 100, 1189-1195.
- DOKE, N. (1983a) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. **Physiological Plant Pathology** 23, 359-367.
- DOKE, N. (1983b) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. **Physiological Plant Pathology** 23, 345-357.
- DOKE, N. and CHAIN, H.B. (1985) Activation of superoxide generation and enhancement of resistance against compatible races of *Phytophthora infestans* in potato plants treated with digitonin. **Physiological Plant Pathology** 27, 323-334.
- DOKE, N. and MIURA, Y. (1995) In vitro activation of NADPH-dependant O₂-generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 46, 17-28.
- DOKE, N., MIURA, Y., SANCHEZ, L.M., PARK, H.J., NORITAKE, T., YOSHIOKA, H. and KAWAKITA, K. (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack : mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - a review. **Gene** 179, 45-51.
- 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. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 10, 646-655.
- DRANSFIELD, M. (1969) Report from Northern States, Nigeria. Empire Cotton Growing Corporation. **Reports from experimental Stations** 24-26.
- DRAPER, J. (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. **Trends in Plant Science** 2, 162-165.
- DURNER, J., SHAH, J. and KLESSIG D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends in Plant Science** 2, 266-274.

- DWYER, S.C, LEGENDRE, L., LOW, P.S. and LETO, T.L. (1995) Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunological related proteins. **Biochemica et Biophysica 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. **Review of Plant Pathology** 59, 153-68.
- EDGERTON, C.W. (1912) The rots of the cotton boll. Louisiana **Agricultural and Experimental Station Bulletin** 137, 133pp.
- EL-NUR, E. (1970) Bacterial blight of cotton. *In: Cotton Growth in the Gezira Environment*. Sudan Agricultural Research Corporation. SIDDIG, M.A. and HUGHES, L. eds. 179-188.
- ELSTNER, E.F. and OSSWALD, W. (1994) Mechanisms of active oxygen activation during plant stress. **Proceedings of the Royal Society of Edinburg** 102B, 131-154.
- ELSTNER, E.F. and HEUPEL, A. (1976) Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gibl.). **Planta** 130, 175-180.
- ENKERLI, J., GISI, U. and MOSINGER, E. (1993) Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis-related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 43, 161-171.
- ENYEDI, A., YALPANI, N., SILVERMAN, P. and RASKIN I. (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Proceedings of National Academy of Science, USA** 89, 2480-2484.
- ESPELIE, K.E., FRANCESHI, V.R. and KOLATTUKUDY, P.E. (1986) Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. **Plant Physiology** 87, 487-492.
- ESSENBERG, M. and PIERCE, M. (1994) Sesquiterpenoid phytoalexins synthesized 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. 183-198.
- EVERDEEN, D.S., KIEFER, S., WILLARD J.J., MULDOON, E.P., DEY, P.M., LI, X.B.

- and LAMPORT, D.T.A. (1988) Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors *in vitro*. **Plant Physiology** 87, 616-621.
- FARBER, J.L., KYLE, M.E. and COLEMAN, J.B. (1990) Biology of the disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation** 62, 670-679.
- FAULWETTER, R.C. (1917) Wind-blown rain, a factor in disease dissemination. **Journal of Agricultural Research** 10, 639-48.
- FERRER, M.A. and BARCELO, A.R. (1994) Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalyzed oxidation of conyferyl alcohol. **Journal of Plant Physiology** 144, 64-67.
- FINDLAY, W.P.K. (1928) Some conditions influencing the development of bacterial disease of cotton (*Bacterium malvacearum*). **Empire Cotton Growing Review** 5, 29-39.
- FLURKEY W. (1990) Electrophoretic and molecular weight anomalies associated with broad bean polyphenoloxidase in SDS-PAGE electrophoresis. **Phytochemistry** 29, 387-391.
- 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. **Cotton et Fibres Tropicales** Fasc. 3, 167-175.
- FREDERICK, S.E. and NEWCOMB, E.H. (1969) Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). **Journal of Cell Biology** 43, 343-353.
- FRY, S.C. (1986) Cross linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology** 37, 165-186.
- GABRIEL, D.W., BURGESS, A. and LAZO, G.R. (1986) Gene for gene interaction of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 83, 6415-19.
- GAFFNEY, T., FRIEDRICH L., VERNOOIJ, B., NEGROTTO, D., NYE, G., UKNES, S., WARD, E., KESSMANN, H. and RYALS, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science** 261, 754-756.

- GIANINAZZI, S., MARTIN, C. and VALLEE, J.C. (1970) Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Série D** 270, 2383-2386.
- GLAZENER, J.A., ORLANDI, E.W., HARMON, G.L. and BAKER, J.C. (1991) An improved method for monitoring active oxygen in bacteria-treated suspension cells using luminol-dependent chemiluminescence. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 39, 123-133.
- GOLDBERG, R., IMBERTY, A., LIBERMAN, A. and PRAT, R. (1986) Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. *In: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxydases.* GREPPIN, H., PENEL, C., and GASPAR, T. eds. University of Geneva, Switzerland. 208-220.
- GOODMAN, R.N. and NAVACKY, A.J. (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens. St Paul : APS Press 244 pp.
- 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. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 47, 339-355.
- GREEN, J.N.M. and BRINKERHOFF, L.A. (1956) Inheritance of 3 genes for bacterial blight resistance in Upland cotton. **Agronomy Journal** 48, 481-5.
- 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, Q.J., TORRES, M.A., FORDHAM-SKELTON, P., HAMMOND-KOSAK, K.E., ROBINSON, N.J. and JONES, J.D.G. (1996) rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. **The Plant Journal** 10, 515-522.
- HALLIWELL, B. (1978) Lignin synthesis : the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. **Planta** 140, 81-88.
- HAMMOND-KOSAK, K.E. and JONES, J.D.G. (1996) Resistance gene-dependant plant defense responses. **Plant Cell** 8, 1773-1791.
- HANSFORD, G.G. (1932) Blackarm disease of cotton in Uganda. **Empire Cotton Growing Review** 9, 21-31.

- HARRISON, S.J., CURTIS, M.D., McINTYRE, C. L., MACLEAN, D.J. and MANNERS, J.M. (1995) Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Strylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 8, 398-406.
- HE, S.Y. (1996) Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria. **Plant Physiology** 112, 865-869.
- HEATH, M.C. and SKALAMERA D. (1997) Cellular interactions between plants and biotrophic fungal parasites. **Advances in Botanical Research** 24, 196-225.
- HILLOCKS, R.J. (1984) Production of cotton plants resistant to *Fusarium* wilt with special reference to Tanzania. **Tropical Pest Management** 30, 234-246.
- HILLOCKS, R.J. (1992) Cotton Diseases. CAB International. Melksham : **Redwood Press**. 415p.
- HOLDEN, D.W. and ROHRINGER, R. (1985) Peroxidases and glycosidases in intercellular fluids from noninoculated and rust-affected wheat leaves. **Plant Physiology** 79, 820-824.
- 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.
- HUNTER, R.E. (1972) Relationship of plant constituents to seedling diseases. Proceeding of the beltwide cotton production research conference, 10-12 Jan; 1972, Memphis, Tennessee, 86p.
- IMBERTY, A., GOLDBERG, R., CATESSON, A.M. (1984) Tetramethylbenzidine and p-phenylenediamine-pyrocatechol for peroxidase histochemistry and biochemistry: two new, non-carcinogenic chromogens for investigating lignification process. **Plant Science Letter** 35,103-108.
- INNES, N.L. (1966) Inheritance of resistance to bacterial blight of cotton. 3. *Herbaceum* resistance transferred to tetraploid cotton. **Journal of Agricultural Science** 66, 433-439.
- JABS, T., DIETRICH, R.A. and DANGL, J.L. (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. **Science** 273, 1853-1856.
- JALILI, B.L. and GROVER, R.K. (1974) Control of *Xanthomonas malvacearum* on cotton by agrimycin and oxanthiin compounds. **Indian Journal of Agricultural Science** 44, 664-6.
- KAUSS, H. and JEBLICK, W. (1996) Influence of salicylic acid on the induction of

- competence for H₂O₂ elicitation. Comparison of ergosterol with other elicitors; **Plant Physiology** 111, 755-763.
- KERBY, K. and SOMMERVILLE, S.C. (1992) Purification of an infection-related, extracellular peroxydase from barley. **Plant Physiology** 100, 397-402.
- KESSMANN, H., STAUB, T., LIGON, J., OOSTENDORP, M. and RYALS, J. (1994). Activation of systemic acquired disease resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology** 100, 359-369.
- KIBA, K., MIYAKE, C., TOYODA, K., ICHINOSE, Y., YAMADA, T. and SHIRAISHI, T. (1997) Superoxide generation in extracts from isolated plant cell walls is regulated by fungal signal molecules. **Phytopathology** 87, 846-852.
- KIEFER, F., SIMON-PLAS, F., MAUME, B. 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 Letters**. in press.
- KNIGHT, R.L. (1944) The genetics of blackarm resistance. 4. *Gossypium punctatum* (Sch. and Thom.) crosses. **Journal of Genetics** 46, 1-27.
- KNIGHT, R.L. (1946) Breeding cotton resistant to blackarm disease (*Bacterium malvacearum*). **Empire Journal of Experimental Agriculture** 14, 153-74.
- KNIGHT, R.L. (1948) The genetics of blackarm resistance. 6. Transference of resistance from *Gossypium arboreum* L. to *G. Barbadosense*. **Journal of Genetics** 48, 359-69.
- KNIGHT, R.L. (1950) The genetics of blackarm resistance. 8. *Gossypium barbadense*. **Journal of Genetics** 50, 67-76.
- KNIGHT, R.L. (1953a) The genetics of blackarm resistance. 9. The gene B6m from *Gossypium arboreum*. **Journal of Genetics** 51, 270-5.
- KNIGHT, R.L. (1953b) The genetics of blackarm resistance. 10. The gene B7 from Stoneville 20. **Journal of Genetics** 51, 515-19.
- KNIGHT, R.L. (1954a) Cotton breeding in the Sudan. Part 1. Egyptian cotton. **Empire Journal of Experimental Agriculture** 22, 68-80.
- KNIGHT, R.L. (1954b) Cotton breeding in the Sudan. Part 3. American Upland cotton. **Empire Journal of Experimental Agriculture** 22, 176-84.
- KNIGHT, R.L. (1963) The genetics of blackarm resistance. 12. Transference of resistance from *G.ossypium herbaceum* to *G.ossypium barbadense*. **Journal of Genetics** 58, 324-46.

- KNIGHT, R.L. and CLOUSTON, T.W. (1939) The genetics of blackarm resistance. 1. Factors B2 and B3. **Journal of Genetics** 38, 133-59.
- KOBAYASHI, A., KOGUCHI Y., KANZAKI H., KAJIYAMA S.I. and KAWAZU K. (1994) A new type of antimicrobial phenolics produced by plant peroxidase and its possible role in the chemical defense systems against plant pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung** 49, 411-414.
- KUC, J. (1982) Induced immunity to plant disease. **Bioscience** 32, 854-860.
- LAEMMLI, V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227, 680-685.
- LEACH, J.E., YOUNG, S.A., CHITTOOR, J.M., ZHU, W. and WHITE, F.F. (1996) Induction of defense responses in rice. *In: Molecular aspects of pathogenicity and resistance: requirement for signal transduction.* MILLS, D., KUNOH, H., KEEN, N.T., and MAYAMA, S. eds. St Paul: APS Press, 115-128.
- LEGENDRE, L. HEINSTEIN, P.F. and LOW, P.S. (1992) Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. **Journal of Biology and Chemistry** 267, 20140-20147.
- LEON, J., LAWTON, M.A. and RASKIN, I. (1995). Hydrogen peroxyde stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology** 108, 11673-1678.
- LEVINE, A., TEHNAKEN, R., DIXON, R. and LAMB, C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell** 6, 427-437.
- LEVINE, A., PENNELL, R.I., ALVAREZ, M.E., PLAMER, R. and LAMB, C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in plant hypersensitive disease resistance response. **Current Biology** 6, 427-437.
- LEYENDECKER, P.J. (1950) Plant disease survey for New Mexico. **Plant Disease Reporter** 34, 39-44.
- LINTHORST, H.J.M. (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Review in Plant Science** 10, 123-150.
- LIU, L., ERIKSSON, K.E. and DEAN, J.F.D. (1995) Localization of hydrogen peroxide production in *Pisum sativum* L. using epi-polarized microscopy to follow cerium perhydroxide deposition. **Plant Physiology** 107, 501-506.
- 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. **Empire Cotton Growing Review** 37, 241-255.
- LOW, P.S. and MERIDA, J.R. (1996) The oxidative burst in plant defense: function

- and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 96, 533-542.
- MADAMANCHI, N.R. and KUC, J. (1991) Induced systemic resistance in plants. *In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals*; COLE, G.T., and HOCH, H.C. eds. New York: plenum.
- MADER, M. and AMBERG-FISHER, W. (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. *Plant Physiology* 70, 1128-1131.
- MAEHLY, A.C. and CHANCE, B. (1954) The assay of catalase and peroxidase, *In: Methods of Biochemical Analysis*. GLICK, D. ed. New York: Interscience Publication Co, 357.
- MALAMY, J., CARR, J.P., KLESSIG, D.F. and RASKIN, I. (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1001-1004.
- 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.
- MARTINEZ, C., GEIGER, J.P., BRESSON, E., DANIELI, J.F., DAI, G.H., ANDARY, C. and NICOLE, M. (1996) Isoperoxidases are associated with resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (race 18). *In: Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. OBINGER, O., BURNER, U., EBERMANN, R., PENEL, C. and GREPPIN, H. eds. Vienna, 327-332.
- MASSEY, R.E. (1929) Blackarm disease of cotton : the development of *Pseudomonas malvacearum* E.F. Smith within the cotton plant. *Empire Cotton Growing Review* 6, 124-46.
- MASSEY, R.E. (1930a) Studies on blackarm disease of cotton. 1. *Empire Cotton Growing Review* 7, 181-95.
- MASSEY, R.E. (1930b) Studies on blackarm disease of cotton. 2. *Empire Cotton Growing Review* 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 of the Cf-gene-dependent defence response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiology* 110, 1367-1379.
- MEDHY, M.C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens.

Plant Physiology 105, 467-472.

- MILOSEVIC, N. and SLUZARENKO, A.J. (1996) Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 49, 143-158.
- MELLON, J. E. and LEE, L. (1985) Elicitation of cotton isoperoxidases by *aspergillus flavus* and other fungi pathogenic to cotton. **Physiological Plant Pathology** 27, 281-288.
- MITTLER, R. and LAM, E. (1996) Sacrifice in the face of foes : pathogen-induced programmed cell death in plants. **Trends in Microbiology** 4, 10-15.
- MITTLER, R., SHULAEV, V., SESKAR, M. and LAM, E. (1996) Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. **The Plant Cell** 8, 1991-2001.
- MOHAN, R. and KOLATTUKUDY, P.E. (1990) Differential activation of expression of a suberization-associated anionic peroxydase gene in near-isogenic resistant and susceptible tomato lines by elicitors. **Plant Physiology** 92, 276-280.
- MONTALBINI, P., BUONAURO, R. and UMESH-KUMAR, N.N. (1995) Peroxidase activity and isoperoxidase pattern in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and other viruses inducing necrotic and non necrotic alterations. **Journal of Phytopathology** 143, 295-301.
- MUELLER, W.C. and BECKMAN, C.H. (1978) Ultrastructural localization of polyphenoloxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany** 56, 1579-1587.
- NATON, B., HAHLBROCK, K. and SCHMELZER, E. (1996) Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. **Plant Physiology** 112, 433-444.
- NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D. and EHRRHARDT, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis** 9, 255-262.
- OLSON, P.D. and VARMER, J.E. (1996) Hydrogen peroxide and lignification. **The Plant Journal** 4, 887-892.
- PARRY, G. (1982) Le cotonnier et ses produits. **Technique en Agriculture et Production Tropicale** (Lavoisier).
- PENG, M. and KUC, J. (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source

- of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf-discs. **Phytopathology** 82, 696-699.
- POLLE, A., OTTER, T. and SEIFERT, F. (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.) **Plant Physiology** 106, 53-60.
- RAO, M.V., PALIATH, G., ORMOD, D.P., MURR, D.P. and WATKINS, C.B. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. **Plant Physiology** 115, 137-149.
- RASKIN, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 43, 439-463.
- RASMUSSEN, J.B., HAMMERSCHMIDT, R. and ZOOK, M.N. (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Plant Physiology** 97, 1342-1347.
- RASMUSSEN, J.B., SMITH, J.A., WILLIAMS, S., BURKHART, W., WARD, E., SOMERVILLE, S.C. RYALS, J. and HAMMERSCHMIDT, R. (1995). CDNA cloning and systemic expression of acidic peroxidases associated with systemic acquired resistance to disease in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 46, 389-400.
- REUVENI, R. and FERREIRA, J.F. (1985) The relationship between peroxidase activity and the resistance of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) to *Verticillium dahliae*. **Phytopathologische Zeitschrift**, 112, 193-197.
- REYERSON, D.E. and HEATH, M.C. (1996) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatment. **The Plant Cell** 8, 393-402.
- RIDE, J.P. (1983) Cell walls and other structural barriers in defence. *In* Biochemical Plant Pathology. CALLOW, J.A. ed. John Wiley and Sons, New-York, 215-236.
- ROBERTSON, E.F., DANNELLY, H.K., MALLOY, P.J. and REEVES, H.C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. **Analytical Biochemistry** 167, 290-294.
- ROLFS, F.M. (1935) Dissemination of the bacterial organism. **Phytopathology** 25, 971.
- ROSS, AF. (1961). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. **Virology** 14: 329-339.

- ROSSI, F. (1986) The O₂- forming NADPH oxidase of the phagocytes : nature, mechanisms of activation and function. **Biochemistry Biophysic Acta** 853, 65-89.
- RUSTERUCCI, C., STALLERT, V. PUGIN, A., RICCI, P. and BLEIN, J.P. (1996) Relationship between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytolaexin production by elicitors in *Nicotiana*. **Plant Physiology** 111, 885-891.
- RYALS, J., UKNES, S. and WARD, E. (1994) Systemic acquired resistance. **Plant Physiology** 104, 1109-1112.
- RYALS, J., NEUENSCHWANDER, U., WILLIT, M., MOLINA, A. and STEINER H.Y. (1996) Systemic acquired resistance. **The Plant Cell** 8, 1899-2019.
- SAKAMOTO, M., UCHIMURA, T. and KOMAGATA, K. (1996) Comparison of H₂O-forming NADH oxidase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541^T and H₂O₂-forming NADH oxidase from *Sporolactobacillus inulinus* NRIC 1133^T. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 82, 531-537.
- SANCHEZ-CASAS, P. and KLESSIG, D.F. (1994) A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. **Plant Physiology** 106, 1675-1679.
- SANDERS, S.P., HARRISSON, S.J., KUPPUSAMY, H.P., SYLVESTER, J.T. and ZWEIER, J.L. (1994) A comparative study of EPR spin trapping and cytochrome C reduction techniques for the measurement of superoxide anions. **Free Radicals in Biological Medicine** 16, 753-761.
- SAUNDERS, J.H. and INNES, N.L. (1963) The genetics of bacterial blight resistance on cotton : further evidence on the gene B6m. **Genetical Research** 4, 382-388.
- SCHMID, P.S. and FEUCHT, W. (1980) Tissue-specific oxidation browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. **Gartenbauwissen-schaft** 45, 68-73.
- SCHNATHORST, W.C., HALISKY, P.M. and MARTIN, R.D. (1960) History, distribution, races and disease cycle of *Xanthonomas malvacearum* in California. **Plant Disease Reporter** 44, 603-608.
- SHARMA, J.R., BEDI, P.S. and SINGH, P.P. (1984) Peroxidase and polyphenol oxidase changes in fusarial wilt resistant and susceptible cultivars of cotton. **Phytopathologia Mediterranea** 23, 79-80.

- SHENG, J. and SHOWALTER, A.M. (1994) Plant cell wall structural proteins : regulated expression and roles in fungal infection. *In: Host wall alterations by parasitic fungi.* PETRINI, O. and OUELLETTE, G.B.O eds. APS Press, 91-102.
- SHIRASU, K. (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependant gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. **The Plant Cell** 9, 261-270.
- SHULAEV, V., LEON, J. and RASKIN, I. (1995) Is salicylic a translocated signal of systemic acquired resistance in plants? **The Plant cell** 7, 1691-1701.
- SIMON-PLAS, F., RUSTERUCCI, C., MILAT, M.L., F., HUMBERT, C., MONTILLET, J.L. and BLEIN, J.P. (1997) AOS production in tobacco cells elicited by cryptogein. **FEBS Letters**, in press.
- SINHA, P.P. and VERMA, J.P. (1983) Role of phylloplane bacterial blight of cotton. **International Journal of Tropical Plant disease** 1, 125-128.
- SMITH, E.F. (1901) The cultural characteristics of *Pseudomonas hyacinthi*, *P. campestris*, *P. phaseoli* and *P. stewarti* from one flagellate yellow bacterium parasitic on plants. **Bulletin of the Division of Vegetable Physiology and Pathology, US Department of Agriculture**, p. 153.
- SMITH, E.F. (1920) Bacterial disease of Plants. Saunders Co, Philadelphia.
- SMITH, A. and HAMMERSCHMIDT, R. (1988) Comparative study of acidic peroxidases associated with induced resistance in cucumber, muskmelon and watermelon. **Physiological and Molecular plant Pathology** 33, 255-261.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B. and METRAUX, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology** 35, 235-270.
- STINZI, A., HEITZ, T., PRASAD V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S. and KAUFFMANN, S. (1993) Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie** 75, 687-706.
- STOUGHTON, R.H. (1930) The influence of environmental conditions on the development of the angular leaf spot disease of cotton. 2. The influence of soil temperature on primary and secondary infection of seedlings. **Annals of Applied Biology** 17, 493-503.
- STOUGHTON, R.H. (1931) The influence of environmental conditions on the development of the angular leaf spot disease of cotton. 3. The influence of air temperature on infection. **Annals of Applied Biology** 18, 523-534.
- 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. **Annals of Applied Biology** 20, 590-611.
- SUMMERMATTER, K., STICHER, L. and METRAUX J.P. (1995) Systemic response in *arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. **Plant Physiology** 108, 1379-1385.
- SUTHERLAND, M.W. (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 39, 79-93.
- TANAKA, Y., MAKISHIMA, T., SASABE, M., ICHINOSE, Y., SHIRAISHI, T., NISHIMOTO, T. and YAMADA, T. (1997) *dad-1*, a putative programmed cell death suppressor gene in Rice. **Plant Cell Physiology** 38, 379-383.
- TARR, S.A.J. (1958) Seed treatment of cotton against diseases and insect pests. **Outlook on Agriculture** 2, 168-77.
- TENHAKEN, R., LEVINE, A., BRISSON, L., DIXON, R. and LAMB, C. (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 92, 4158-4163.
- TEXIER, P.H. (1996) Le coton oléagineux en Afrique. OCL, **Oléagineux, Corps gras, Lipides** 3, 111-113.
- THIERS, H.D. and BLANK, L.M. (1951) A histological study of bacterial blight of cotton. **Phytopathology** 1, 499-510.
- TIEDEMANN, A.V. (1997) Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 50, 151-166.
- TRIPLETT, A. and MELLON, J.E. (1992) Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant science** 81, 147-154.
- TZENG, D.D. and DE VAY, J.E. (1993) Role of oxygen radicals in plant disease development. **Advances in Plant Pathology** 10, 1-34.
- VAN HUYSTEE, R.B. (1987) Some molecular aspects of plant peroxidases biosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology** 38, 205-219.
- VAN LOON, L.C. and VAN KAMMEN A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tobaccum* var. "Samsun" and "Samsun NN". **Virology** 40, 199-211.
- VEECH, J.A. (1976) Localisation of peroxidase in *Rhizoctonia solani*-infected

- cotton Seedling. **Physiology and Biochemistry** 66, 1072-1076.
- VENERE, R.J. (1980) Role of peroxidase in cotton resistant to bacterial blight. **Plant Science Letter** 20, 47-56.
- VERA-ESTRELLA, R. BIUMVALD, E. and HIGGINS, V. (1992) Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. Evidence for the involvement of active oxygen species. **Plant Physiology** 99, 1028-1215.
- 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. **Cotton Growing Review** 47, 203-5.
- VERMA, J. P. and SINGH, R.P. (1971a) Epidemiology and control of bacterial blight of cotton. **Proceedings of the Indian National Science Academy Part B** 74, 326-31.
- VERMA, J.P. and SINGH, R.P. (1971b) Pectic and cellulolytic enzymes of *Xanthomonas malvacearum* and the incidence of bacterial blight of cotton. **Current Science** 40, 21-2.
- 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 Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae** 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. RAYCHAUHURI, S.P. and VERMA, J.P. eds. Lucknow University, India, 134-145.
- VERMA, J.P., SINGH R.P. and NAYAK, M.L. (1975) Laboratory evaluation of chemicals against *Xanthomonas malvacearum* the incitant of bacterial blight of cotton. **Indian Phytopathology** 28, 170-3.
- VERMA, J.P., NAYAK, M.L. and SINGH, R.P. (1977) Survival of *Xanthomonas malvacearum* under North Indian conditions. **Indian Phytopathology** 30, 361-5.
- 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. **Indian Phytopathology** 36, 574-7.
- VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., MORSE, A., REIST, R., KOLDITZ-JAHWAR, R.,

- WARD, E., UKNES, S., KESSMANN, H. and RYALS, J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal for inducing systemic acquired resistance. **The Plant cell** 6, 959-965.
- VINA, D. and GRANADA, G.A. (1986) Evaluation of the production of certified cotton seed in relation to the incidence of angular leaf spot. **Review of Plant Pathology** 67, 142.
- WANG, S.C. and PINCKARD, J.A. (1973) Peroxidase activity in the developing cotton boll and its relation to decay by *Diplodia gossypina*. **Phytopathology** 63, 1095-1099.
- WANG, H. LI, J. BOSTOCK, R.M. and GILCHRIST, D.G. (1996) Apoptosis : a functional paradigm to programmed cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. **The Plant Cell** 8, 375-391.
- WARD, E.R., UKNES, S.J., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S., WIEDERHOLD, D.L., ALEXANDER, D.C., AHL-GOY, P. and RYALS, J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agent that induce systemic acquired resistance. **The Plant cell** 3, 1085-1094.
- WEINDLING, R. (1948) Bacterial blight of cotton under conditions of artificial inoculation. **US Department of Agriculture Technical Bulletin** N° 956.
- WICKENS, G.M. (1953) Bacterial blight of cotton : a survey of present knowledge, with particular reference to possibilities of control of the disease in African rain-grown countries. **Empire Cotton Growing Review** 30, 81-103.
- WICKENS, G.M. (1956) Vascular infection of cotton by *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dow. **Annals of Applied Biology** 44, 129-37.
- YALPANI, N., LEON, J., LAWTON, M. and RASKIN, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. **Plant Physiology** 103: 315-321
- YOUNG, S.A., GUO, A., GUIKEMA, J.A., WHITE, F.F. and LEACH, J.E. (1995) Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interaction with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. **Plant Physiology** 107, 1333-1341.
- ZHANG, Z.G., COLLINGE, D.B. and THORDAL-CHRISTENSEN, H. (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. **The Plant Journal** 8, 139-145.

ANNEXES

Publications

- Martinez, C., Geiger, J.P., Bresson, E., Daniel, J.F., Dai, G.H., Andary, C. et Nicole, M. 1996. Isoperoxidases are associated with resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (race 18). In : **Plant Peroxidases : Biochemistry and Physiology** pp 327-332 Eds Obinger, O., Burner, U. Ebermann, R., Penel, C. and Greppin, H. Vienna.
- Dai, G.H., Nicole, M., Martinez, C., Bresson, E., Daniel, J.F., Andary, C. et 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. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 49, 285-306.
- Nicole, M., Dai, G.H., Geiger, J.P., Martinez, C., Andary, C., Bresson, E. et Daniel, J.F. 1997. Phenolics and peroxidases during resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (race 18). **Acta Phytopathologica Sinica**, 2, 170-173.
- Martinez, C., Montillet, J.L., Bresson, E., Agnel, J.P., Dai, G.H., Daniel, J.F., Geiger, J.P. et Nicole, M. 1997. NADH-dependent peroxidases are involved in the production of reactive oxygen associated with the hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* race 18. **The Plant Journal**, soumis.
- Nicole, M., Martinez, C., Daniel, J.F., Bresson, E., et Geiger J.P. 1998. The hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Recent Research Developments in Microbiology**, 2, 000-000, sous presse.
- Martinez, C., Bresson, E., Daniel, J.F., Geiger, J.P. et Nicole, M. 1998. Increased activity of peroxidase isozymes associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* (Race 18) and cotton. **Physiological and Molecular Plant Pathology** en préparation.

Communications et posters

- Martinez C., Bresson E., Assigbetse K., Daniel J.F., Fernandez D., Geiger J.P. Montillet J.L. et Nicole M. 1998. Une peroxydase apoplastique NADH-

- dépendante génère de l'oxygène réactif durant la réaction hypersensible différenciée par le cotonnier en réponse à *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Rencontres de Bactériologie, Aussois France, janvier.
- Martinez, C., E. Bresson, J.L. Montillet, J.P. Agnel, J.F. Daniel, J.P. Geiger et M. Nicole. 1997. The oxydative burst in *Xanthomonas*-infected cotton cells is associated with hypersensitive cell death. **18ème Congrès International de la Société Méditerranéenne de Phytopathologie**, Montpellier, Juin.
- Martinez, C., Geiger, J.P., Bresson, E., Daniel, J.F., Dai, G.H., Andary, C., Platero, D. et Nicole, M. 1996. Peroxidases et résistance du cotonnier a la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (race 18). **4ème Congrès de la Société Française de Phytopathologie**, Nice, Novembre.
- Martinez, C., Geiger, J.P., Bresson, E., Daniel, J.F., Dai, G.H., Andary, C. et Nicole, M., 1996. Isoperoxidases are associated with resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (race 18). Affiche, **4ème Congrès International sur les Peroxydases**, Vienne, Autriche, juillet.
- Martinez, C. Bresson, E. Dai, G.H., Daniel, J.F., Nicole, M., Andary, C. et Geiger, J.P. 1995. Etude de l'activité peroxydase associée à la bactériose du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) causée par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*. Communication, **Forum des jeunes chercheurs, Société Française de Physiologie Végétale**, Clermond-Ferrand, avril.

ABSTRACT

Xanthomonas campestris pv. *malvacearum* (*Xcm*) race 18-infected cotton plants (*Gossypium hirsutum*) were investigated for peroxidase activities in leaves and inoculated cotyledons. Peroxidase activity was shown to increase significantly in the cotyledons of the resistant variety, ten hours after inoculation. The inhibition of bacterial population was correlated to the level of peroxidase activity in cotyledons. Seven peroxidase (five anionic and two cationic) isoforms (P1 to P7) were detected in cotyledons of both susceptible and resistant varieties. In the incompatible interaction, activity of the P1, P2 and P7 isoperoxidases only were stimulated. During the compatible interaction and the systemic resistance, the five anionic isoforms were activated.

Increase in the P7 isoform activity (pI 9.45) was observed three hours after inoculation in the resistant variety inoculated by *Xcm*. This peroxidase, demonstrated to be NADH-dependent was able to generate $O_2^{\cdot-}$; it was cytolocalized in the apoplast. Production of H_2O_2 was also visualized. A time course of peroxidase mRNA expression revealed higher levels of mRNA three, twelve and twenty-four hours post-inoculation.

Inoculation of cotyledons of the both varieties led to inhibition of bacterial multiplication in leaves that were post-inoculated. This inhibition was proportional to the peroxidase activity. During the incompatible interaction, accumulation of salicylic acid in cotyledons was detected between three and six hours after inoculation, following the oxidative burst. A close relationship in time was shown between salicylic acid accumulation and increase in peroxidase activity in leaves. We demonstrated that the signal likely involved in the induction of SAR was generated three hours after bacterial inoculation. In the compatible interaction, SAR was not associated with an increase in salicylic acid content. Infiltration of exogenous H_2O_2 in cotyledons resulted in an increase in salicylic acid in both cotyledons and leaves, while infiltration of salicylic acid in cotyledons stimulated peroxidase activity in both cotyledons and leaves.

This study demonstrated that superoxide anions are generated by a NADH-dependent peroxidase in *Xcm*-infiltrated portions of resistant cotyledons. It suggests that hydrogen peroxyde and salicylic acid play a key role in cotton resistance to bacterial blight.

RESUME

Les activités peroxydasiques du cotonnier (*Gossypium hirsutum*) ont été étudiées dans les cotylédons infectés par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*) et les feuilles. L'activité peroxydasique totale augmente significativement dans les cotylédons de la variété résistante, dix heures après l'inoculation par *Xcm*. Le taux d'inhibition de la croissance bactérienne est corrélé au niveau d'activité peroxydasique observé dans les cotylédons inoculés.

Sept isoformes (cinq anioniques et deux cationiques) (P1 à P7) ont été détectées dans les cotylédons sains ou inoculés des deux variétés. Dans le cas de l'interaction incompatible, la forte augmentation d'activité affecte essentiellement les trois isoenzymes P1, P2 et P7. Dans le cas de l'interaction compatible ou de l'activation systémique d'activité, les cinq isoformes anioniques sont stimulées. L'augmentation de l'activité de l'isoforme P7 (pI 9,45) a été mise en évidence trois heures après l'inoculation de la variété résistante par *Xcm*. Cette peroxydase, NADH-dépendante localisée dans l'apoplaste, génère des ions $O_2^{\cdot-}$. Une production d' H_2O_2 a également été visualisée. Lors d'une cinétique d'expression des ARNm de peroxydase, les résultats semblent indiquer que la quantité d'ARNm est supérieure lors des temps trois heures et à partir de douze heures suivant l'inoculation.

La préinoculation des cotylédons de deux variétés de cotonnier, résistante et sensible, conduit à une inhibition de la multiplication bactérienne dans les feuilles post-inoculées par *Xcm*, proportionnelle au niveau d'activité peroxydasique systémiquement induit. Succédant au burst oxydatif, un pic d'acide salicylique est détecté dans les cotylédons résistants entre trois et six heures après l'inoculation. Une concordance dans le temps entre l'accumulation d'acide salicylique foliaire et l'augmentation de l'activité peroxydasique dans les feuilles a été observée lors de l'interaction incompatible. Le temps de "latence" séparant l'inoculation des cotylédons du déclenchement de la SAR est évalué à trois heures. Lors de l'interaction compatible, l'augmentation systémique d'activité peroxydasique dans les feuilles ne semble pas être liée à une accumulation d'acide salicylique. L'infiltration d' H_2O_2 dans les cotylédons provoque une accumulation d'acide salicylique dans les cotylédons et dans les feuilles. L'infiltration d'acide salicylique dans les cotylédons induit une augmentation d'activité peroxydasique dans les cotylédons et dans les feuilles.

Cette étude démontre qu'une peroxydase NADH-dépendante apoplastique génère des ions superoxydes dans les cotylédons d'une variété résistante, trois heures après infection par *Xcm*. Elle suggère que le peroxyde d'hydrogène et l'acide salicylique jouent un rôle important dans la résistance du cotonnier à la bactériose.