

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

THESE

Présentée à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier
pour obtenir le DIPLOME DE DOCTORAT

SPECIALITE : SCIENCES AGRONOMIQUES (BACTERIOLOGIE)

Formation doctorale : Biologie intégrative et adaptation des plantes cultivées

Ecole doctorale : Biologie Intégrative

Laboratoire : Résistance des Plantes (UMR Diversité et Génome des Plantes Cultivées)

LA PEROXYDATION DES LIPIDES :
ORIGINE ET ROLE DANS LA MORT CELLULAIRE HYPERSENSIBLE DU
COTONNIER (*Gossypium hirsutum*)
A Xanthomonas campestris (axonopodis) pathovar malvacearum

par

JALLOUL Aïda

Soutenue le 22 mars 2002 devant le jury composé de :

M. Notteghem J.L., Professeur, ENSA-Montpellier

M. Blein J.P., Directeur de Recherche, INRA Dijon

M. Saindrenan P., Directeur de Recherche, CNRS Orsay

M. Azmeh F., Professeur, Université de Damas, Syrie

M. Abou-Ghorrah M., Maître de Conférence, Université de Damas

M. Montillet J.L., Directeur de recherche, CEA Cadarache

M. Nicole M., Directeur de recherche, IRD Montpellier

Président

Rapporteur

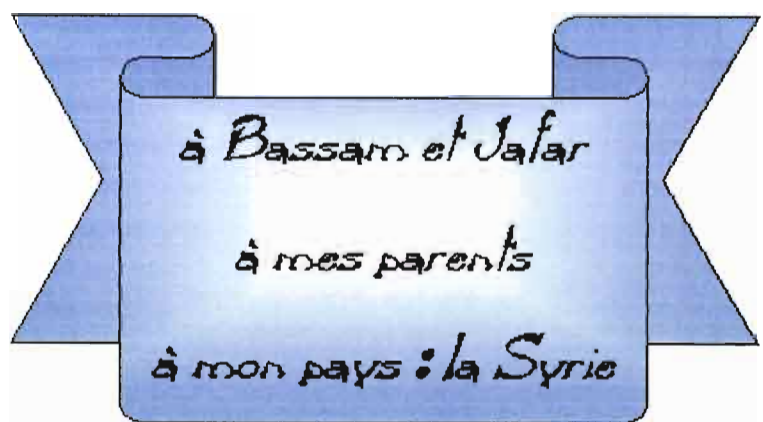
Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



à Bassam et Jafar

à mes parents

à mon pays : la Syrie

Remerciements

Je remercie les gouvernements syrien et français et l'IRD d'avoir financé ces années de thèse. Ce travail a été réalisé à l'IRD de Montpellier au sein de l'équipe "résistance des plantes" de l'UMR « Diversité et Génome des Plantes Cultivées ». Je tiens à remercier toutes les personnes qui, par leur aide, leurs conseils et leur sympathie, ont contribué à son bon déroulement.

J'exprime toute ma gratitude à M. Michel NICOLE, mon directeur de thèse, de m'avoir intégré dans son équipe, pour son encadrement et ses précieux conseils nécessaires à l'élaboration de ce travail expérimental et rédactionnel, et pour la confiance qu'il m'a accordée et ses encouragements sans cesse renouvelés.

Je remercie chaleureusement M. Jean-Luc MONTILLET du laboratoire d'Ecophysiologie Végétale et de Microbiologie au CEA de Cadarache de m'avoir fait profiter de son expérience, de sa fructueuse et enrichissante collaboration et d'avoir examiné mon travail.

Je remercie sincèrement les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Monsieur Jean-Loup NOTTEGHEM de m'avoir accepté dans sa formation doctorale et d'avoir bien voulu présider le jury de cette thèse. Messieurs Patrick SAINDRAN et Jean-Pierre BLEIN qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail de thèse. Merci également à Messieurs Fawaz AZMEH et Mahmoud ABU-GHORRAH d'avoir eu la gentillesse de participer au jury de cette thèse et pour leur soutien permanent en Syrie.

Un grand merci à M. Michel AUDRAN pour m'avoir permis d'effectuer les expériences de dosage de l'acide jasmonique au sein de son laboratoire à la faculté de pharmacie de Montpellier, et pour ses conseils précieux.

Je remercie Messieurs Jean-Paul GEIGER, Jean-François DANIEL, Komi ASSIGBETSE et Alain CLERIVET pour m'avoir fait profiter de leur expérience de phytopathologistes et toute ma gratitude à Mesdames Diana FERNANDEZ, Ghislaine FERRARD-POUGET et Marie-Claude BON pour leur sympathie, leur disponibilité et pour leur aide inestimable.

Mes remerciements chaleureux à Etienne DELANNOY pour son soutien permanent, le bon déroulement de nos expériences communes et pour m'avoir initié aux techniques de la biologie moléculaire.

Je n'oublie pas M. Jean-Pierre AGNEL du CEA de Cadarache d'avoir effectué des analyses sur la peroxydation des lipides, Mademoiselle Bénédicte Marion et Monsieur Guillaume BOUGARD de la Faculté de pharmacie pour leur aide technique en spectrométrie de masse ainsi que Mesdames Sylvie DOULBEAU et Isabelle ROCHETTE pour leur aide technique en HPLC.

Je tiens également à remercier Madame Margaret ESSENBERG, Messieurs Hervé CHRESTIN et Pierre TROUSSLOT pour les discussions intéressantes de physiologie.

Un grand merci à toutes les personnes permanentes ou de passage au laboratoire pour leur disponibilité, leur amitié et leurs encouragements : Marie, Agnès, Sandra, Maymouna, Philippe(s), Frédérique, Anne, Isabelle, Aurélie, Rebika, Despina, Geneviève, Martine, Myriam et Michelle.....

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance à ma famille, à mes parents, à mes amis pour leur soutien permanent et tout particulièrement à Mademoiselle Claire DUHAZE de Rennes qui m'a aidé à surmonter tous les écueils qui ont parsemé mon séjour à Rennes et Angers.

Abréviations

[α -³²P] dCTP : déoxycytidine-triphosphate marqué au phosphore 32 en position α
acd : accelerated cell death
AJ : acide jasmonic
AS : acide salicylique
AGPI : acide gras polyinsaturé
AOS : allène oxyde synthase
BA2H : benzoic acid 2-hydroxylase
Bcl-2 : protéine de cellule de lymphocyte B de type 2 (B-cell lymphoma-2)
BSA : bovine serum albumine
BSTFA: N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacétamide
BTH : Benzothiodiazole
C : carboxyle terminal
C18:1 : oleic acid
C18:2 : linoleic acid
C18:3 : linolenic acid
C20:4 : arachionic acid
cADPR : ADP-ribose cyclique
CDPK : calcium dependent protein kinase
cGMP : GMP cyclique
CHS : chalcone synthase
COXs : cyclooxygénases
CTR1 : constitutive triple response 1
DAB : 3,3 diaminobenzidine
DES : divinyl ether synthase
dnd1 : defense, no death
DPI : diphénylène iodonium
EAS : epoxy alcool synthase
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
eir1 : ethylene insensitive root-1
ETR1 : ethylene receptor-1
FM : fresh matter
FW : fresh weight
GC-MS : gas chromatography-mass spectrometry
15-HEDE : 15-hydroxy-11,13(Z,E)-eicosadienoic acid
HFA : hydroxy fatty acids
HP: Hewlett-Packard
HPLC : high performance liquid chromatography
9-H(P)ODE: 9-hydro(pero)xy-10,12(Z,E)-octadecadienoic acid
13-H(P)ODE: 13-hydro(pero)xy-9,11(Z,E)-octadecadienoic acid
9-H(P)OTE: 9-hydro(pero)xy-10,12,15(E,Z,Z)-octadecatrienoic acid
12-H(P)OTE: 12-hydro(pero)xy-9,13,15(Z,E,Z)-octadecatrienoic acid
13-H(P)OTE: 13-hydro(pero)xy-9,11,15(Z,E,Z)-octadecatrienoic acid
16-H(P)OTE: 16-hydro(pero)xy-9,12,14(Z,Z,E)-octadecatrienoic acid
HR : hypersensitive response
hrp : hypersensitive reaction and pathogenicity
JA : jasmonic acid
JMT : jasmonic acid methyle-transferase
IEF : isoelectric focusing
INA : acide 2,6-dichloroisonicotique
ISR : induced systemic resistance
Kb : kilobases ou kilo-paire de bases
L° : radical lipidique
L° : radical alkyle
LAR : local acquired resistance
LO° : radical alkoxyle
LOO° : radical peroxy
LOOH: hydroperoxyde lipidique
LOX: lipoxygénase

LRRs : leucine-rich repeat motifs
lsd : lesion stimulating disease resistance response
LZ : domaine leucine-zipper
MAP-Kinase: protéine kinase activée par agent mitogène
MDA : malonic dialdéhyde
MeJA : méthyl-jasmonate
MeSA : méthyl-salicylate
N : amino acide N terminal
NaBH₄ : borohydrure de sodium
NAD(P)⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide (pohosphate)
NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (pohosphate) réduit
NO : nitric oxide
NOS : nitric oxide synthase
ONOO⁻ : peroxy-nitrate
PAL : phénylalanine ammonia-lyase
PF : poids frais
phox : phagocyte oxydase
pI : point isoelectric
PIN : protease inhibitors
PK : protéine kinase
POX : peroxygénase
PP : protéine phosphatase
PR : pathogenesis related
Protéine G : GTP-binding protein
Pti1 : Pto-interacting 1
PUFA : poly-unsaturated fatty acids
PVPP : polyvinylpolypyrrolidone
ROS : reactive oxygen species
RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction
SA : salicylic acid
SAR : systemic acquired resistance
SDS : dodécyl sulfate de sodium
SIM : selected ion monitoring
SIPK : salicylic acid-induced protein kinase
SIS : SA-independent, systemically induced genes
sni1 : supresseur of npr1-inducible
SOD : superoxyde dismutase
SSC : sel de sodium citrate
ssi1 : supress SA-insensitive phenotype
STS : silvar thiosulfate
TAE : tampon Tris acétique EDTA
TIR : récepteurs similaires à Toll et au récepteur de l'interleukine-1
TMC : triméthylchlorosilane
Vita-E : vitamine E
VMT : virus de mosaïque du tabac
WIPK : wounding-induced protein kinase
Xcm : *Xanthomonas campestris* pv. *malvoearum*

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
A. Les mécanismes de la résistance spécifique des plantes aux parasites	3
1. Le phénomène de reconnaissance	3
1.1. La reconnaissance spécifique repose sur le modèle « gène pour gène »	3
1.2. La reconnaissance par des éliciteurs généraux	6
2. Perception des éliciteurs <i>via</i> des récepteurs	10
3. Transduction du signal intracellulaire	11
3.1. Les protéines G	11
3.2. Les flux ioniques	12
3.3. Phosphorylation et déphosphorylation des protéines	13
3.4. Les formes réactives de l'oxygène	14
3.5. Le monoxyde d'azote	19
4. Transduction du signal intercellulaire	20
4.1. L'acide salicylique	20
4.2. L'éthylène	23
4.3. L'acide jasmonique	24
4.4. Autres signaux	26
5. Interconnexion des différentes voies de signalisation	27
5.1. Phénomène de potentialisation	27
5.2. Relations entre l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène	27
5.3. Rôle prépondérant de la protéine NPR1	28
6. La mort cellulaire programmée de type hypersensible	29
B. Les phénomènes de peroxydation dans la mort cellulaire	32
1. Oxydation des protéines	33
2. Altération des acides nucléiques	34
3. Oxydation des lipides	34
3.1. Auto-oxydation	35
3.2. Oxydation enzymatique	36
C. Les interactions cotonnier – <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>malvacearum</i>	40
1. Les maladies du cotonnier	41
2. <i>Xcm</i> : agent de la bactériose du cotonnier	42
2.1. Taxonomie, morphologie et physiologie	42
2.2. Le cycle de la bactérie	42
2.3. Variabilité de l'agent pathogène	43
3. La bactériose du cotonnier	44
3.1. Historique et répartition de la maladie	44
3.2. Les symptômes aux champs causés par <i>Xcm</i>	45
3.3. L'incidence de la bactériose sur la culture cotonnière	46
3.4. Les moyens de lutte connus contre la bactériose	46
4. Nature et mécanismes de la résistance du cotonnier à <i>Xcm</i>: état de l'art	48
D. Objectifs de la thèse	50
CHAPITRE 1	
La peroxydation des lipides dans l'interaction cotonnier-<i>Xanthomonas</i>.	
Rôle des lipoxygénases dans la réaction hypersensible et le	53
Symptoms of cell death during cotton HR and disease; correlation with water loss	59
LOX-mediated lipid peroxidation in cotton interacting with <i>Xcm</i>	60

Characterization of LOX activity in <i>Xcm</i> -cotton interactions	62
Expression of <i>Ghklox 1</i> gene during <i>Xcm</i> -cotton interactions	64
Discussion	65
Clonage et caractérisation du gène GhkLOX 1 de lipoxygénase induit lors de la HR du cotonnier à <i>Xanthomonas</i>	72
CHAPITRE 2	
Les voies de signalisation impliquées dans l'activation de la lipoxygénase au cours de la réaction hypersensible du cotonnier à <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>malvacearum</i>	80
Effect of SA on LOX activation	84
Effect of MeJA on LOX activation	85
Effect of MeJA on H ₂ O ₂ and SA production	86
Activation of cell death by LOX substrates in SA- or MeJA-treated cotton cotyledons	87
Bacterial growth in MeJA- or SA-treated cotyledons infected with <i>Xcm</i> race 18 or race 20.	88
Accumulation of JA during compatible and incompatible interactions or following SA infiltration	88
Discussion	89
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	97
BIBLIOGRAPHIE	105
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	136

INTRODUCTION GENERALE

A la différence des animaux, les plantes supérieures sont incapables de mobilité ; elles ne peuvent se déplacer pour subvenir à leurs besoins, échapper à un danger ou modifier une position inconfortable. Dans leur lutte permanente pour la survie, les plantes ont développé un système de défense formidablement diversifié qui leur permet de résister à la plupart des agressions de nature biotique (champignons, bactéries, virus, plantes parasites, nématodes ou ravageurs) ou de nature abiotique (stress hydrique, thermique, ionisant, ou pollution, *etc...*). En effet, dans la nature, malgré la présence continue d'organismes potentiellement pathogènes, la règle générale chez les plantes est la résistance. Les cas d'infection restent rares, mais quand ils se produisent, leurs effets peuvent être très graves. Pour s'opposer à leurs agresseurs potentiels, les plantes possèdent une batterie d'armes défensives. Parfois, celles-ci préexistent dans l'hôte avant tout contact avec l'agent pathogène. Constitutives de certaines plantes, elles confèrent une résistance générale hautement efficace. Il peut s'agir de barrières morphologiques qui empêchent la pénétration ou le développement des microorganismes, ou bien de substances chimiques jouant un rôle décisif dans la résistance à l'infection. Mais, le plus souvent, ce n'est qu'après la rencontre de la plante avec son agresseur que les mécanismes de défense se déclenchent. Dans certains cas, on ne remarque que de tardives ou discrètes réponses: la plante présente une sensibilité importante au parasite. Dans d'autre cas, au contraire, une défense active est rapidement induite : des modifications importantes du métabolisme du végétal sont déclenchées, des substances défensives apparaissent et le développement de la maladie est bloqué : la plante est dite résistante.

Des facteurs spécifiques de la plante et de l'agent pathogène déterminent la nature des interactions physiques, chimiques ou biologiques qui, s'établissant dans les tous premiers moments de leur rencontre, conditionnent l'évolution vers la résistance (incompatibilité) ou la sensibilité (compatibilité), autrement dit vers l'expression rapide ou non des mécanismes de défense. Dans la plupart des cas, l'interaction incompatible se traduit par la mort rapide des cellules infectées et la formation de lésions nécrotiques localisées autour des sites de pénétration du parasite. Il s'agit de la **réaction d'hypersensibilité** ou **RH** qui s'accompagne de modifications métaboliques importantes permettant de confiner l'agresseur à son site

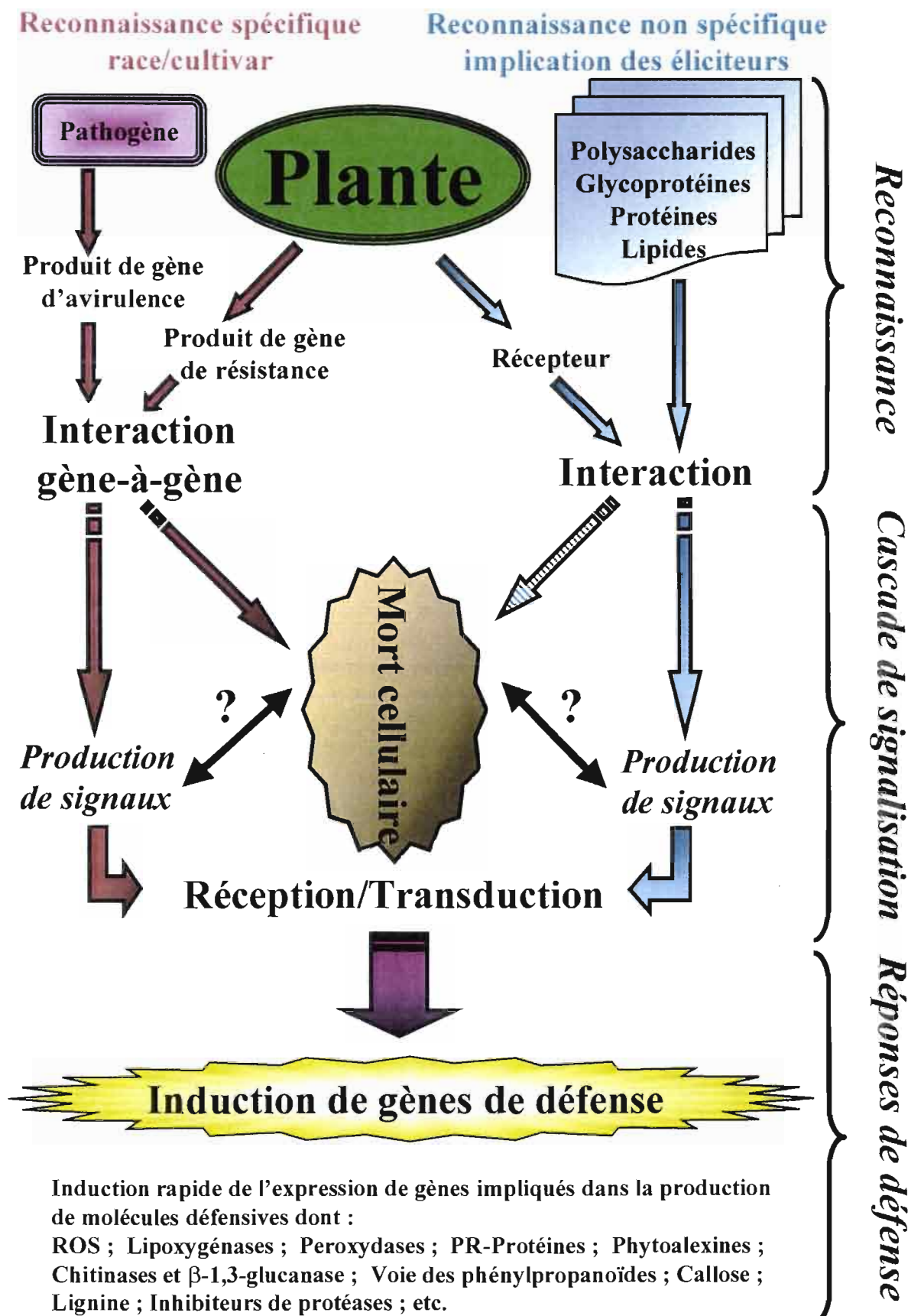


Figure 1 : Schéma d'élicitation des réponses de défense chez les plantes.

de pénétration (Goodman et Novacky, 1994). Le terme de RH pris au sens strict correspond à l'aboutissement du processus de mort cellulaire. Cependant, dans la littérature, le terme RH au sens large qualifie un mécanisme de défense des plantes qui englobe la mort cellulaire et les réponses de défense associées au niveau local (Pontier *et al.*, 1998). A cette résistance locale, est souvent associée une résistance systémique qui s'établit au niveau de la plante entière. Il s'agit de la résistance systémique acquise (SAR) ; plus tardive et moins intense, elle met la plante dans un état de veille qui la maintient prête à réagir à une attaque ultérieure (Maleck et Dietrich, 1999).

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

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

1. Le phénomène de reconnaissance

Deux types de reconnaissance peuvent être proposés : la **reconnaissance spécifique** qui fait intervenir le produit du gène de résistance de la plante et le produit du gène d'avirulence du pathogène correspondant et la **reconnaissance non spécifique** qui implique des éliciteurs généraux (Figure 1).

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

Dans certains cas de maladies microbiennes, la résistance est spécifiée par la présence chez la plante d'un **gène de résistance (R) dominant** auquel correspond chez le pathogène un **gène d'avirulence (Avr) également dominant**. Cette relation est appelée « **gène pour gène** ». L'existence des gènes d'avirulence a été découverte à l'issue d'une étude sur l'interaction entre le lin et *Melampsora lini* (Flor, 1942). Flor définit ainsi cette base génétique de la spécificité entre pathogène et hôte. Plusieurs modèles ont été proposés pour donner une interprétation physiologique de la reconnaissance « gène à gène ». Il y a quelques années déjà, le modèle ligand/récepteur semblait le plus probable (Keen, 1992). Il postule que le produit du gène d'avirulence (*Avr*) joue le rôle de ligand spécifiquement reconnu par un

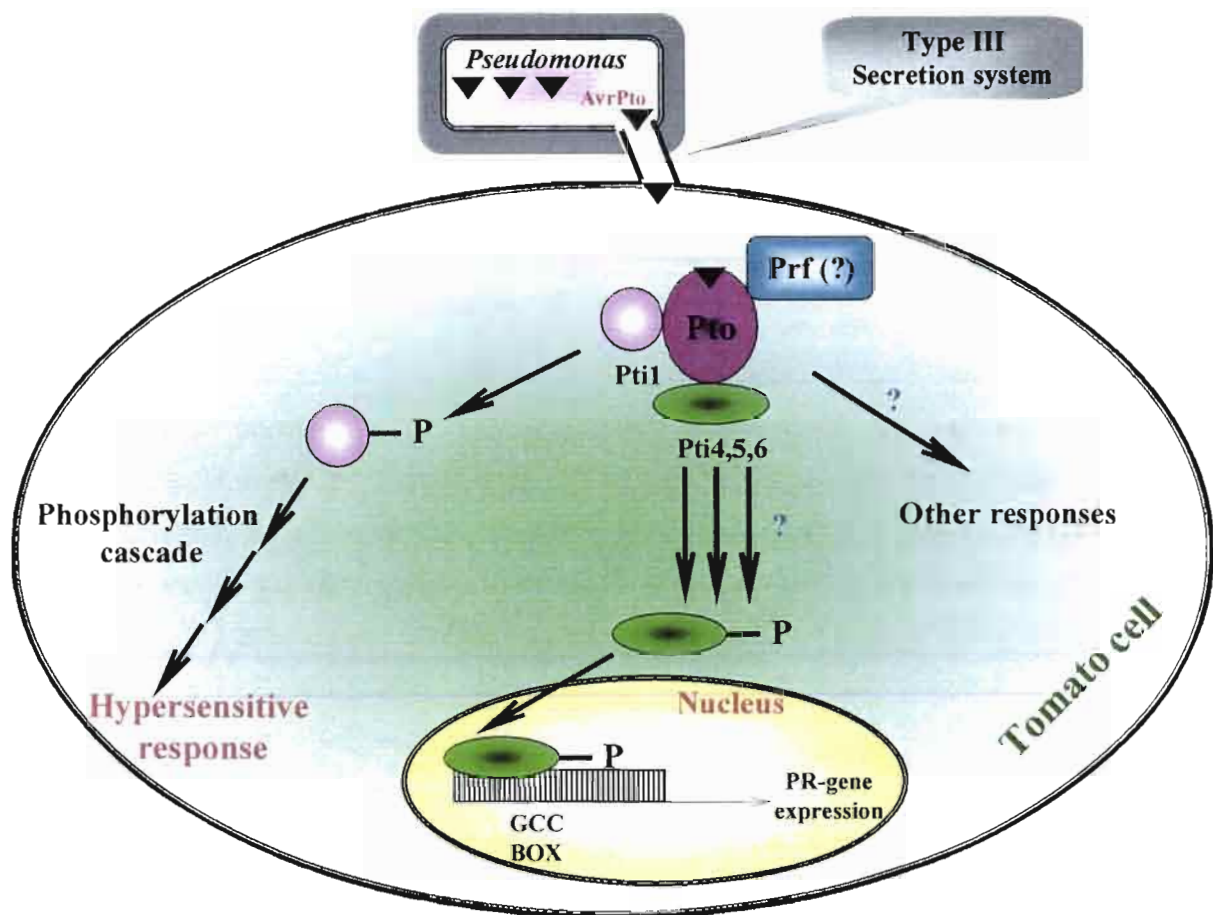


Figure 2: Modèle concernant la transduction du signal au cours de l'interaction Pto/AvrPto dans l'interaction incompatible tomate/*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (d'après Sessa et Martin, 2000).

AvrPto est sécrétée dans la cellule végétale par un système de sécrétion de type III. Suite à l'interaction directe entre Pto et AvrPto, Pto interagirait physiquement avec Pti1 qu'elle phosphorylerait. Pti1 phosphorylée pourrait être impliquée dans la cascade de transduction du signal qui conduirait à la mort cellulaire de type hypersensible. Pto interagirait aussi avec d'autres facteurs Pti4, Pti5, Pti6 qui, eux-mêmes, pourraient être impliqués dans l'activation de gènes de défense dont les protéines PR. Le produit du gène *Prf* est nécessaire à l'induction de mort cellulaire, mais son rôle n'est pas encore bien identifié.

récepteur codé par le gène de résistance (*R*). Récemment, des preuves biochimiques et moléculaires ont permis de valider ce modèle à l'aide du système double-hybride dans la levure pour deux couples *Avr/R*. Il s'agit de l'interaction entre *Avr Pto/Pto* chez la tomate (Scofield *et al.*, 1996 ; Tang *et al.*, 1996 ; Sessa et Martin, 2000) (Figure 2) et *Avr pita/pita* chez le riz (Bryan *et al.*, 1999).

1.1.1. Les gènes d'avirulence (*Avr*)

Le premier gène d'avirulence bactérien isolé et cloné a été le gène *AvrA* de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* race 6 (Staskawicz *et al.*, 1984). Ce gène induit l'hypersensibilité dans les cultivars de soja, portant le gène de résistance *Rpg2*. Depuis, plus de trente gènes *Avr* ont été isolés, aussi bien lors d'interactions avec des virus qu'avec des agents fongiques ou bactériens (Leach et White, 1996) (Tableau 1). Mais la fonction biologique de ces gènes n'est pas déterminée pour la plupart des agents pathogènes (Mansfield, 1997). Les gènes *Avr* bactériens codent, dans la plupart des cas, pour des protéines solubles intracellulaires contrairement à celles codées par les gènes de champignons qui sont extracellulaires. D'une manière générale, les gènes *Avr* codent soit pour des produits ayant une activité élicitrice directe des réponses de défense (Leach et White, 1996) tel le produit du gène *Avr9* (un peptide nommé AVR9) isolé de *Cladosporium fulvum* sur tomate et les protéines de la capsid du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT), soit pour des enzymes impliquées dans la synthèse de molécules élictrices, comme *AvrD* de *Ps. syringae* qui code une enzyme impliquée dans la synthèse de dérivés lipidiques, les syringolides, responsable de l'induction d'une RH sur certains cultivars de soja.

Chez les bactéries, le fonctionnement des gènes *Avr* dépend de celui des gènes *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity). En effet, des mutants *hrp*, possédant des gènes *Avr* fonctionnels, sont incapables de déclencher une RH dans des cultivars possédant les gènes de résistance correspondants (Gopolan et He, 1996). Les produits des gènes *Avr* sont probablement sécrétés et injectés dans le cytoplasme de la cellule végétale *via* le système de sécrétion de type III codé par les gènes *Hrp*. En effet, il faut que les produits *Avr* pénètrent à l'intérieur de la cellule végétale pour induire une RH (Leach et White, 1996 ; Hutcheson, 1998).

1.1.2.. Gènes de résistance

Depuis 1992, des gènes de résistance ont été clonés chez différentes espèces végétales (Tableau 1). Cette avancée dans la compréhension des interactions

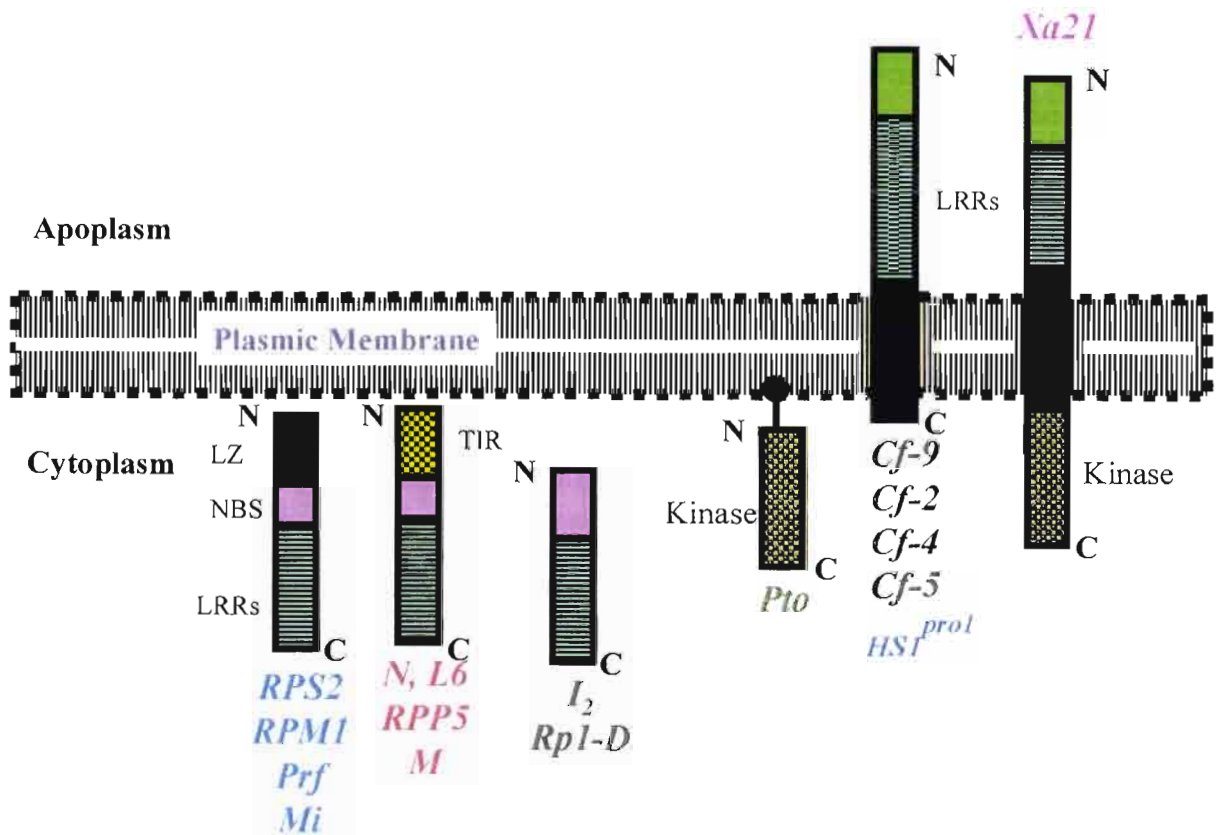


Figure 3 : Représentation des caractéristiques structurales des produits de différents gènes de résistance (d'après Noir et Lashermes, 2000).

LRR : séquence riche en leucines. NBS : site de liaison aux nucléotides. LZ : domaine "leucine zipper". TIR : récepteurs similaires à Toll et au récepteur de l'interleukine-1. N : amino acide N terminal. C : carboxyle terminal. Les noms des différents gènes de résistance sont indiqués sous leur représentation graphique.

plante/pathogène n'a été possible qu'après la généralisation des techniques de mutagenèse insertionnelle par transposons, en particulier par ceux du maïs, efficaces sur diverses espèces (maïs, tomate, tabac, lin, *Arabidopsis*) (Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Dinesh-Kumar *et al.*, 1995).

Le premier gène de résistance cloné a été le gène *Hm1* du maïs. Il confère la résistance vis-à-vis de *Cochliobolus carbonum* race 1. *Hm1* code pour une réductase impliquée dans la détoxification de la toxine HC de *C. carbonum* (Johal et Briggs, 1992). En 1993, Martin et ses collaborateurs ont cloné le gène de résistance *Pto* de la tomate qui confère la résistance vis-à-vis des races de *Ps. syringae* pv. *tomato* portant le gène *AvrPto*. Le gène *Pto* code pour une sérine-thréonine protéine kinase. La reconnaissance du ligand par le produit du gène *Pto* se traduirait par un signal secondaire de transduction (phosphorylation) activant les gènes de défense de la plante (Figure 2) (Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Sessa et Martin, 2000).

Bien que les gènes de résistance (*R*) aient été isolés de différentes plantes et interagissent avec des gènes *Avr* de bactéries, de champignons ou de virus, ils présentent des régions analogues comprenant des séquences répétées riches en leucine à l'exception du gène *Pto* de la tomate (Bent, 1996 ; Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Hutcheson, 1998 ; Martin, 1999). Ces motifs sont communs aux protéines végétales ou animales impliquées dans les interactions protéine-protéine (récepteurs), et dans des mécanismes de transduction (phosphorylation) (Hammond-Kosack et Jones, 1997). D'autres caractéristiques structurales permettent ensuite de définir plusieurs sous-groupes. Il s'agit de la présence dans la protéine de sites de liaison à des nucléotides (NBS), de domaine « leucine zipper », de domaines sérine / thréonine kinase et de domaines Toll/interleukine-1 (Figure 3). Par exemple, le domaine Toll /interleukin-1, comme son nom l'indique, présente des homologies de séquence avec le domaine cytoplasmique de la protéine Toll de la *Drosophile* et le récepteur de l'interleukine-1 (IL-R) de mammifère. Les produits de gènes *R* possédant ce domaine pourraient être à l'origine d'une cascade de signaux intracellulaires similaire à celle décrite pour Toll et IL-R chez les animaux (Hammond-Kosack et Jones, 1997; Sessa et Martin, 2000 ; Martin, 1999).

De manière intéressante, les produits des gènes de résistance qui semblent être localisés dans le cytoplasme sont impliqués dans la reconnaissance de produits des gènes *Avr* viraux ou bactériens, dont l'activité nécessite une localisation intracellulaire (Hammond-Kosack et Jones, 1997). A l'opposé, les produits des gènes *R* trans-membranaires possédant un domaine LRR extracellulaire confèrent la

Tableau 1 : Systèmes gène d'avirulence/gène de résistance confirmant la relation gène pour gène mise en évidence depuis 1992

Plante hôte	Gène de résistance	Pathogène	Gène d'avirulence
Tomate	<i>Pto, Prf</i>	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrPto</i>
Arabidopsis	<i>Rps2, Rpm1</i>	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>tomato</i> et <i>maculicola</i>	<i>AvrRpt2, AvrRmp1</i>
Arabidopsis	<i>Rpp5</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	<i>AvrPp5</i>
Poivron	<i>Bs1, Bs2, Bs3</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>AvrBs1, AvrBs2, AvrBs3, Avrhxv</i>
Soja	<i>Rpg1, Rpg2, Rpg3, Rpg4</i>	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> et <i>tomato</i>	<i>AvrA, AvrB, AvrC, AvrD</i>
Tabac	<i>N</i>	TMV virus	Gène des protéines de la capside
Tomate	<i>Cf9, Cf2, Cf4, Cf5</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr9, Avr2, Avr4, Avr5</i>
Lin	<i>L⁶, M</i>	<i>Melampsora lini</i>	<i>AL⁶, AM</i>
Coton	<i>B2, B4, b6,b7, Bln, Bsm, B101, B102</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	<i>AvrB101, AvrB102, AvrBln, AvrB4, Avrb6, Avrb7, pthN</i>
Riz	<i>xa-5, Xa-7, Xa-10, Xa-21</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>AvrXa5, AvrXa7, AvrXa10, AvrXa21</i>
Tomate	<i>Mi</i>	<i>Meloidogyne</i> spp.	?
Tomate	<i>I₂</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	?
Maïs	<i>Rp1-D</i>	<i>Puccinia sorghi</i>	?
Maïs	<i>Hm1</i>	<i>Cochiobolus carbonum</i> race 1	?
Bettrave	<i>HS1^{pro-1}</i>	<i>Heterodera sacharii</i>	?

résistance à des champignons se développant dans l'apoplasme où ils libèrent leurs facteurs *Avr* (Figure 3). C'est par exemple des produits des gènes de résistance *Cf2*, *Cf4*, *Cf5*, *Cf9* et des facteurs d'avirulence *Avr2*, *Avr4*, *Avr5*, *Avr9* dans l'interaction tomate/*C. fulvum* (Hammond-Kosack et Jones, 1997). Enfin, les derniers travaux ont révélé que le modèle gène pour gène requiert non seulement les déterminants R et *Avr*, mais également d'autres protéine-hôtes (Dixon *et al.*, 2000) s'associant au binôme R/*Avr* pour activer la défense ; l'appellation « résistosome » a été proposée pour ce complexe protéique (Lahaye et Bonas, 2001).

1.2. La reconnaissance par des éliciteurs généraux

Un éliciteur est une molécule capable d'induire au moins une des réponses typiques de défense, comme la synthèse de phytoalexines, cela en l'absence de toute infection (Blumwald *et al.*, 1998 ; Dixon *et al.*, 1994 ; Hahn, 1996). La caractéristique principale des éliciteurs généraux est qu'ils ne reproduisent pas la spécificité de reconnaissance gène pour gène (Keen, 1992) et sont généralement actifs sur une gamme variée de plantes. Ils peuvent provenir d'agents pathogènes (éliciteurs exogènes) ou des plantes (éliciteurs endogènes). Ils sont de nature polysaccharidique, lipidique, ou (glyco)protéique (Benhamou, 1996 ; Boller, 1995 ; Côté et Hahn, 1994 ; Ebel et Mithöfer, 1998 ; Hahn, 1996 ; Klarzynski *et al.*, 2000).

1.2.1. Les éliciteurs polysaccharidiques

Trois types majeurs d'éliciteurs de nature polysaccharidique ont été identifiés : les β -1,3 glucanes, la chitine et le chitosan (chitine dé-acétylée) provenant des parois fongiques (Figure 4) et les oligogalacturonides, résidus d'acides galacturoniques en liaison α -1,4 dérivés de la pectine, issus des parois cellulaires.

Des préparations de glucanes à forte activité élicitrice ont été obtenues à partir de nombreux champignons phytopathogènes (Benhamou, 1996). Cependant, l'éliciteur saccharique le mieux caractérisé reste un heptaglucone (chaîne linéaire de cinq résidus de glucose en liaison β -1,6 avec deux chaînes latérales de β -1,3 glucose ; Figure 4) isolé des parois du champignon *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycina* après hydrolyse acide ménagée (Sharp *et al.*, 1984). Il induit la synthèse de phytoalexines chez le soja. Des études de relations structures-fonctions ont montré que l'activité élicitrice de l'heptagluconose est fortement corrélée à un motif structural bien particulier (Cheong *et al.*, 1991). Cependant, les réponses de défense induites peuvent

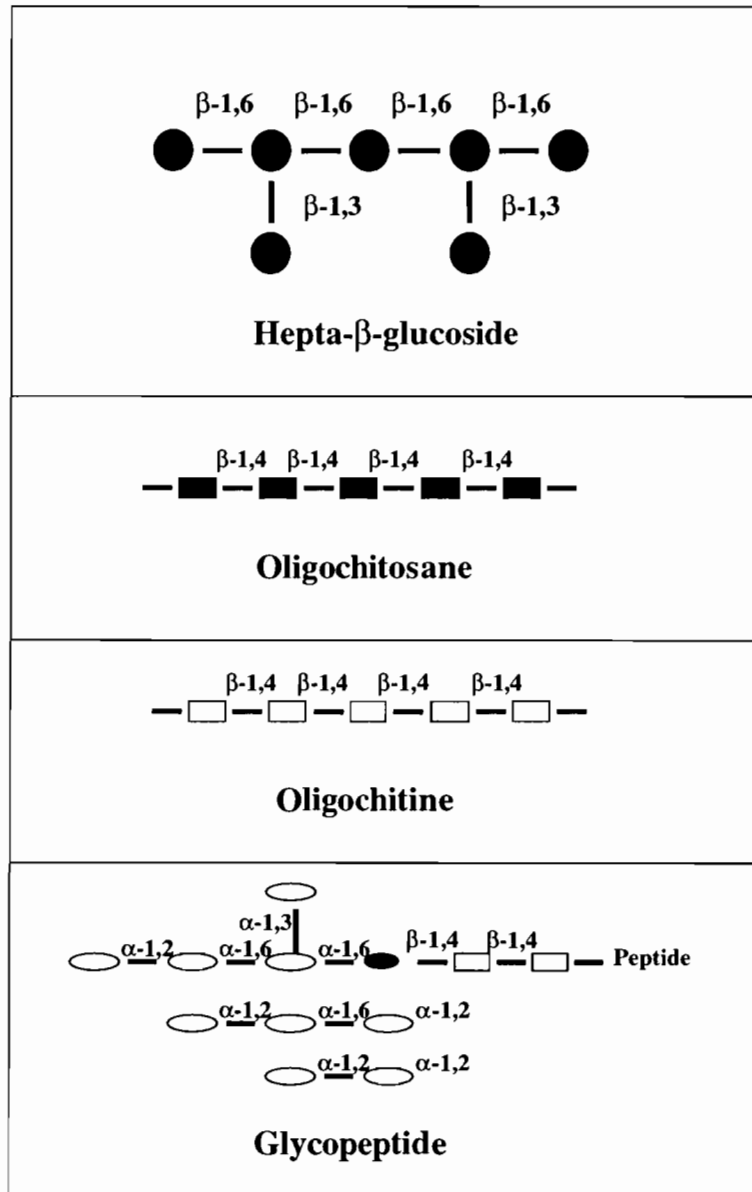


Figure 4 : Structure de certains éliciteurs fongiques.

●, β-glucose ; ■, β-glucosamine ; □, β-N-acétylglucosamine ;

○, α-mannose ; ●, β-mannose

varier en fonction de la structure des glucanes et du végétal utilisé (Yamaguchi *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré que des β -1,3 glucanes linéaires induisent un ensemble de réponses de défense chez plusieurs espèces végétales ainsi qu'une résistance à une bactérie nécrotrophe, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Klarzynski *et al.*, 2000).

Des fragments de parois fongiques comme les oligomères de chitine sont également connus pour induire des réponses de défense dans plusieurs systèmes végétaux (Conrath *et al.*, 1989 ; Ren et West, 1992 ; Savouré *et al.*, 1997). Un site de liaison à haute affinité pour un fragment de chitine a été identifié dans la membrane plasmique de cellules de riz (Ito *et al.*, 1997). La nature et l'intensité des réponses de défense induites par ces éliciteurs dépend d'une part de la plante testée et, d'autre part, du degré de polymérisation des fragments éliciteurs (Boller, 1995 ; Brunner *et al.*, 1998). Il en va de même pour des éliciteurs polysaccharidiques endogènes extraits de parois de plantes (Côté et Hahn, 1994 ; Jin et West, 1984 ; Mathieu *et al.*, 1991).

On peut insister sur le fait que la plupart de ces éliciteurs polysaccharidiques endogènes ou exogènes est généré par des hydrolases de l'hôte et/ou de l'agresseur. Ces molécules peuvent donc probablement intervenir comme signaux de « deuxième génération » dans la cascade de réception-transduction participant à l'expression des réponses de défense (Fritig *et al.*, 1998 ; Lamb *et al.*, 1989).

1. 2. 2. Les éliciteurs lipidiques

L'acide arachidonique et d'autres acides gras insaturés, libérés lors de l'infection de la pomme de terre par *P. infestans*, figurent parmi les éliciteurs les plus efficaces de la synthèse de phytoalexines (Bostock *et al.*, 1981) et de l'activité lipoxigénase (LOX) (Bostock *et al.*, 1992). L'ergostérol, qui est le stérol majeur de la membrane lipidique chez les champignons, induit l'alcalinisation du milieu de culture de suspensions cellulaires de tomate, alors que les stérols d'origine animale ou végétale n'ont aucun effet (Granado *et al.*, 1995). Enfin, les syringolides, éliciteurs race-spécifique générés par la bactérie *Ps. syringae* pv. *tomato* portant le gène *AvrD*, induisent une RH chez les cultivars de soja portant le gène *Rpg4* (Keen *et al.*, 1993 ; Midland *et al.*, 1993 ; Leach and White, 1996).

1. 2. 3. Les éliciteurs protéiques et glycoprotéiques

Parmi les éliciteurs (glyco)protéiques, certains induisent une RH au même titre que les éliciteurs race-spécifiques, d'autres induisent seulement des réponses de

défense sans mort cellulaire. Une glycoprotéine de 42 KDa isolée du filtrat de culture de *P. megasperma* f. sp. *glycinea* fait partie de ces éliciteurs non nécrosants (Hahlbrock *et al.*, 1995 ; Bailleul *et al.*, 1995). Cette glycoprotéine, active sur les suspensions cellulaires de persil (Parker *et al.*, 1991), renferme un peptide de 13 résidus (pep 13) portant l'activité élicitrice (Nürnberg *et al.*, 1994). Des peptides correspondant à des domaines de la flagelline des eubactéries élicitent les réponses de défense à des concentrations subnanomolaires sur des cellules de tomates et des plantes d'*Arabidopsis* (Felix *et al.*, 1999 ; Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Plusieurs éliciteurs protéiques non spécifiques et inducteurs de RH ont également été caractérisés. Il s'agit par exemple d'une protéine bactérienne PopA1 isolée de *Ralstonia solanacearum* (Arlat *et al.*, 1994), d'une glycoprotéine de 34 KDa isolée de la paroi de *P. parasitica* var. *nicotianae* (Mateos *et al.*, 1997 ; Séjalon-Delmas *et al.*, 1997), de xylanases (Yano *et al.*, 1998) et de cellulases (Martinez *et al.*, 2001) issues de champignons du genre *Trichoderma*. Mais deux autres classes d'éliciteurs protéiques nécrosants font l'objet d'études plus documentées : il s'agit des harpines et des élicitines.

Les harpines

Les harpines ont été purifiées chez les bactéries du genre *Erwinia* (Bauer *et al.*, 1995 ; Mukherjee *et al.*, 1997 ; Wei *et al.*, 1992) et *Pseudomonas* (He *et al.*, 1993). Elles sont associées à la membrane externe de la bactérie et ne sont pas détectables dans le surnageant de culture. Ces protéines présentent plusieurs caractéristiques biochimiques (sensibilité aux protéases, thermo-résistance et hydrophilie) et structurales (richesse en résidus glycine et faible poids moléculaire). Elles sont codées par des gènes du groupe *hrp*. La sécrétion des harpines dépend elle-même de produits d'autres gènes *hrp* (Charkowski, *et al.*, 1997 ; Wei et Beer, 1993) au même titre que certaines protéines issues de gènes *Avr* bactériens. Les harpines provoquent une rapide dépolarisation de la membrane cytoplasmique accompagnée des flux d'ions, la production de formes réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation de protéines kinases dans des suspensions cellulaires de tabac (Adam *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1993 ; Popham *et al.*, 1995). Elles induisent une nécrose chez des plantes non-hôte tels que le tabac, la tomate, la pomme de terre et le poivron. Elles sont aussi capables d'induire une résistance systémique acquise (SAR) dépendante de l'acide salicylique (AS) (Dong *et al.*, 1999).

Les élicitines

Une autre classe importante d'éliciteurs protéiques inducteurs de nécroses est constituée par la famille des élicitines (Ricci, 1997 ; Yu, 1995). Les élicitines sont de petites protéines de faible masse moléculaire (environ 10 KDa ou 98 acides aminés) sécrétées par la plupart des espèces de *Phytophthora*, à l'exception des isolats virulents de *P. parasitica* var. *nicotianae*, pathogène du tabac (Bonnet *et al.*, 1994 ; Kamoun *et al.*, 1994). Deux classes structurales d'élicitines (α et β) peuvent être distinguées en fonction de leur point isoélectrique (pI) et de leur activité biologique. Les β -élicitines au pI basique ont un pouvoir nécrosant plus important que les α -élicitines au pI acide lorsqu'elles sont appliquées au sommet de la tige des plants de tabacs coupés (Kamoun *et al.*, 1993 ; Nespoulos *et al.*, 1992 ; Yu, 1995).

La cryptogéine (une élicitine de type β) issue de *P. cryptogea*, est l'une des élicitines les plus étudiées. Il a été montré qu'elle possède une fonction de transporteur de stérols (Mikes *et al.*, 1997). On peut souligner que les espèces de *Phytophthora* sont incapables de synthétiser les stérols nécessaires à leur croissance et à leur reproduction (Mikes *et al.*, 1997). Il est possible que les cryptogéines permettent le transport de ces molécules lipidiques à partir de la membrane plasmique de la plante jusqu'au micro-organisme (Buhot *et al.*, 2001). La plante reconnaîtrait donc un élément issu de l'agent pathogène, qui pourrait être essentiel à la survie de celui-ci.

L'application de la cryptogéine au sommet de tige des tabacs coupés induit une nécrose systémique au niveau des feuilles (Ricci *et al.*, 1989). Il semble que la mort cellulaire induite par l'élicitine soit de nature apoptotique (Levine *et al.*, 1996). Des études utilisant la cryptogéine sur des cultures cellulaires de tabac ont montré l'induction des flux d'ions (Ca^{2+} , H^+ , Cl^-) (Blein *et al.*, 1991 ; Pugin *et al.*, 1997 ; Tavernier *et al.*, 1995 ; Yu, 1995), la phosphorylation de protéines (Viard *et al.*, 1994 ; Yu, 1995), la production de ROS (Bottin *et al.*, 1994 ; Simon-Plas *et al.*, 1997 ; Yu, 1995), la synthèse d'éthylène et l'accumulation de phytoalexines (Milat *et al.*, 1991). Les ROS induites par la cryptogéine semblent impliquer une NADPH oxydase (Allan et Fluhr, 1997 ; Pugin *et al.*, 1997). Une action de la cryptogéine sur la réorganisation des pectines a également été mise en évidence (Roussel *et al.*, 1999 ; Kieffer *et al.*, 2000).

Il a été montré récemment que les élicitines reproduisent la spécificité de reconnaissance gène-à-gène non pas au niveau variétal, mais au niveau du genre. En effet, *P. infestans*, agent pathogène de la pomme de terre et de la tomate, produit une élicitine INF1. Cette élicitine induit la réaction d'hypersensibilité sur des plantes du

genre *Nicotiana* qui sont non-hôtes pour *P. infestans*. Cependant, un *P. infestans* transgénique affecté dans la biosynthèse de INF1 provoque une maladie sur *N. benthamiana*, plante non-hôte du *P. infestans* sauvage (Kamoun *et al.*, 1998). INF1 agit donc comme un facteur d'avirulence lors de l'interaction entre *N. benthamiana* et *P. infestans*.

Les élicitines sont capables d'induire une SAR qui protège les plantes contre des infections par différents microorganismes pathogènes (Bonnet *et al.*, 1996 ; Keller *et al.*, 1996a). L'induction de cette SAR est expliquée par la diffusion de l'élicitine et semble contrôlée par une molécule signal endogène, l'AS (Keller *et al.*, 1996b). Récemment, il a été montré que des tabacs transgéniques exprimant constitutivement la cryptogéine survivent à l'infection par le champignon virulent *P. parasitica* var. *nicotianae* (Tepfer *et al.*, 1998). D'autres tabacs transgéniques exprimant la cryptogéine sous contrôle d'un promoteur inductible du gène *hrs203J* développent une RH localisée au niveau des sites d'infection par *P. parasitica* var. *nicotianae*. Ces plantes sont aussi résistantes à d'autres agents pathogènes fongiques (Keller *et al.*, 1999).

2. Perception des éliciteurs *via* des récepteurs

Comme on peut le constater, il existe une grande diversité au sein des molécules susceptibles d'être reconnues par la plante mais aussi une grande diversité dans la spécificité de la perception. La perception des éliciteurs implique parfois une certaine spécificité, puisque certains éliciteurs ne sont actifs que sur une gamme donnée d'espèces végétales. Cependant, la plupart de ces molécules sont capables d'activer des mécanismes de signalisation et de défense communs. Il semble dès lors que les étapes de transduction de signaux et l'expression de réponses de défense en aval des événements de reconnaissance impliquent des mécanismes très conservés chez les plantes.

Des études ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la transduction du signal intracellulaire aboutissant à l'activation des réponses de défense et de la mort cellulaire. Le modèle le plus fréquent repose sur l'affinité d'éliciteurs pour des récepteurs membranaires à l'origine d'une cascade d'événements qui va conduire à l'induction de l'expression de gènes de défense (Yang *et al.*, 1997). L'existence de sites membranaires (Boller, 1995 ; Hahn, 1996) fixant des éliciteurs généraux a été montrée dans de nombreuses études, notamment pour la cryptogéine chez le tabac (Wendehenne *et al.*, 1995), des oligomères de chitine chez le tomate (Baureithel *et al.*, 1994), un heptaglucone fongique chez le soja

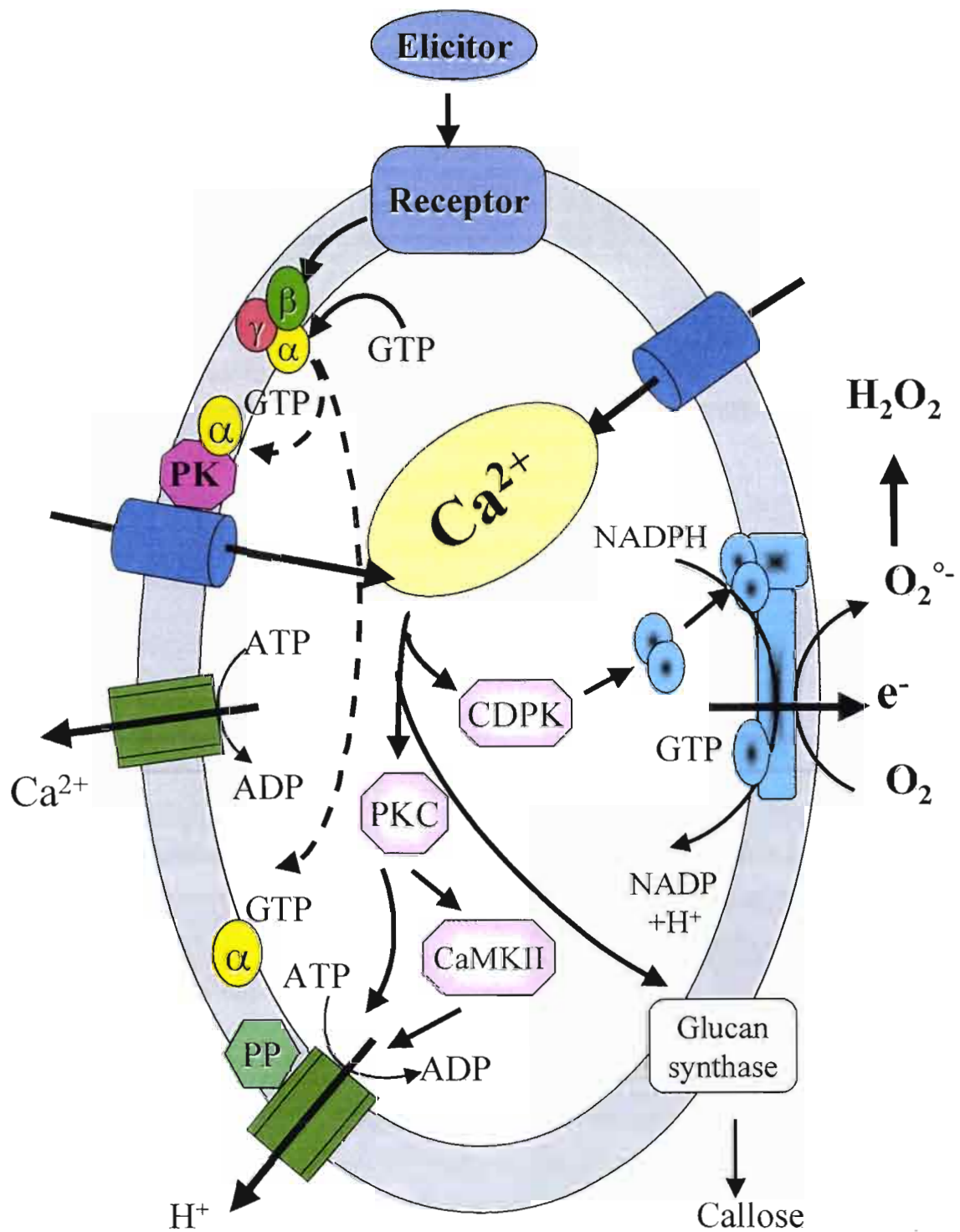


Figure 5 : Modèle hypothétique des évènements précoces suivants la perception de l'agent pathogène (Blumwald *et al.*, 1998).

Le récepteur reconnaissant l'éliciteur interagirait avec les protéines G couplées à un récepteur membranaire. L'activation des protéines G activerait l'influx de Ca^{2+} qui induirait des protéines kinases (PKC, CamKII, CDPK) Ca^{2+} dépendantes puis des enzymes comme celles responsables de la synthèse de callose. CDPK activeraient la production des ROS.

(Umemoto *et al.*, 1997) et «pep13» chez le persil (Nürnbergger *et al.*, 1995). La caractérisation précise de la structure de ces récepteurs « potentiels » permettra de mieux comprendre les interactions impliquées.

3. Transduction du signal intracellulaire

En aval de la perception de l'agent pathogène ou de l'éliciteur *via* un récepteur potentiel, se mettent en place des étapes de signalisation intracellulaire extrêmement complexes (Figure 5). Cette cascade de transduction du signal conduisant à la RH est associée à des modifications biochimiques, cellulaires et moléculaires, et fait intervenir, entre-autres, des protéines G (GTP-binding protein), des flux ioniques, des cascades de phosphorylation / déphosphorylation, des formes réactives d'oxygène (ROS) et le monoxyde d'azote (NO).

3. 1. Les protéines G

L'activation de protéines G constitue l'un des événements les plus précoces après l'étape de reconnaissance. Quand un éliciteur interagit avec un récepteur membranaire, il active une protéine G de transduction du signal qui, à son tour, active une enzyme effecteur, producteur d'un messenger secondaire intracellulaire. Les protéines G sont regroupées en deux classes, les protéines G hétérotrimériques et les protéines G monomériques nommées "small G proteins" (Blumwald *et al.*, 1998). L'activation des protéines G semble s'établir en amont du burst oxydatif chez le tabac, la tomate et le riz (Kieffer *et al.*, 1997 ; Ono, *et al.*, 2001 ; Vera-Estrella *et al.*, 1994), de l'influx de Ca^{2+} (Chandra et Low, 1997 ; Scheel, 1998) et de l'accumulation de phytoalexines chez le riz (Ono *et al.*, 2001). Des tabacs transgéniques exprimant la toxine cholérique, qui induit de manière constitutive et irréversible les protéines G, ont des niveaux de AS et de protéines PR (Pathogenesis-Related) très élevés (Beffa *et al.*, 1995). Des effets similaires ont été reportés dans le cas de tabacs transgéniques surexprimant une protéine G (Sano et Ohashi, 1995). Les protéines G semblent donc réguler l'expression des réponses de défense dans plusieurs systèmes végétaux. Chez les animaux, les protéines G induisent l'activation de phospholipases. Chez les plantes, l'implication de phospholipases A et C dans la défense est maintenant bien établie (Chandra *et al.*, 1996 a; Legendre *et al.*, 1993).

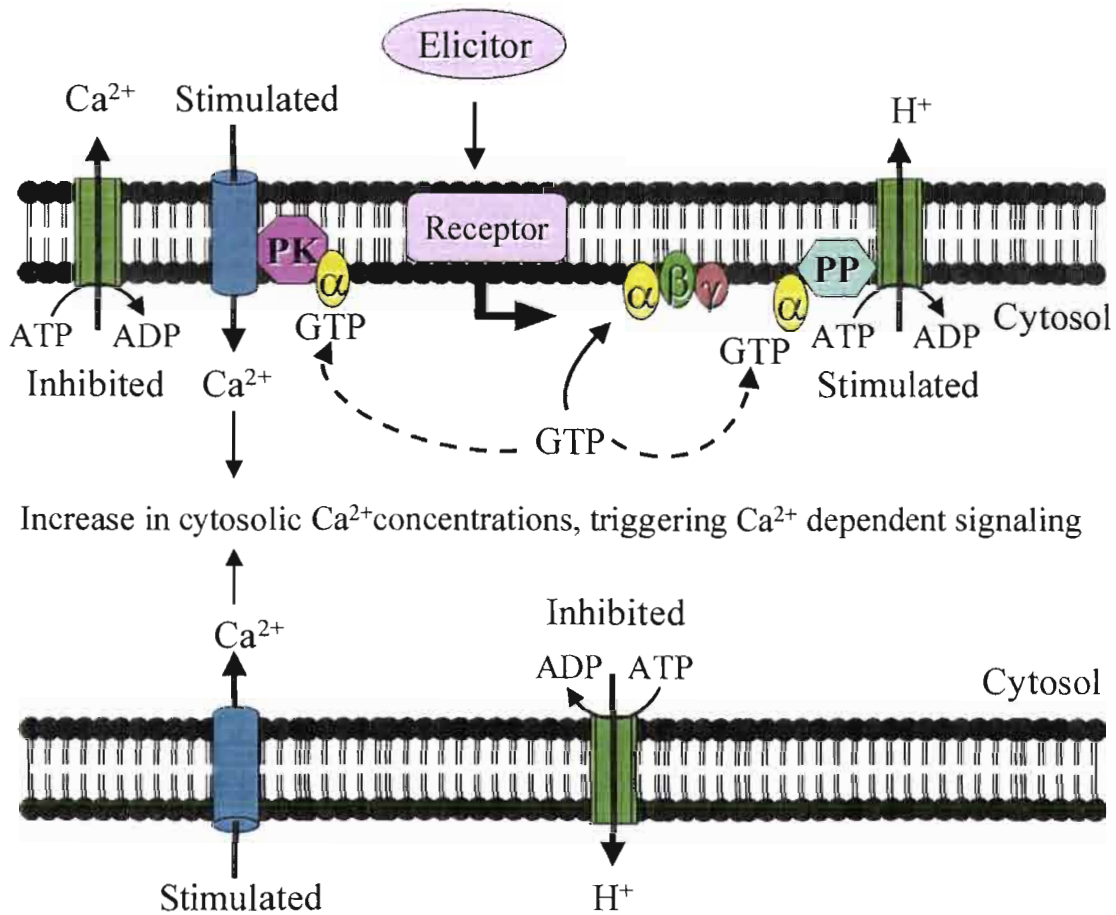


Figure 6: Evènements de signalisation conduisant à l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium (Blumwald *et al.*, 1998).

La fixation de l'éliciteur à son récepteur enclenche l'activation de la protéine G, ce qui provoque l'activation d'une phosphatase (PP) qui stimulerait l'efflux des ions H⁺ et une protéine kinase (PK) qui activerait l'ouverture de canaux calciques. Ainsi, l'hyperpolarisation de la membrane plasmique stimule l'ouverture des canaux calciques. De plus, l'inhibition de la Ca²⁺-ATPase membranaire conduirait à l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Alternativement, l'inhibition de H⁺-ATPase par une dépolarisation membranaire, active l'ouverture de canaux calciques dépolarisés.

3. 2. Les flux ioniques

L'un des évènements précoces observés dès les premières minutes après la reconnaissance est la perturbation des propriétés de la membrane plasmique par une dépolarisation transitoire accompagnée de mouvements d'ions caractérisés par l'efflux de K^+ et Cl^- et l'influx de Ca^{2+} et H^+ (Pontier *et al.*, 1998). Ces flux d'ions sont nécessaires et suffisants pour induire la production des ROS, l'activation de gènes de défense et la synthèse de phytoalexines (Jabs *et al.*, 1997). Blatt et ses collaborateurs (1999) ont montré que des flux de K^+ interviendraient aux cours de l'interaction gène à gène *Avr9/Cf9*. Cependant, les flux de K^+/H^+ ne sont pas impliqués dans l'induction du burst oxydatif chez le soja traité avec des éliciteurs oligogalacturoniques (Low et Merida, 1996), suggérant que l'importance de ce processus dépend du système étudié (Boweler et Fluhr, 2000). Une H^+ -ATPase membranaire pourrait participer au processus, entraînant une acidification ou une alcalinisation significative du milieu extracellulaire (Blumwald *et al.*, 1998) (Figure 6).

Le rôle de Ca^{2+} en tant que messenger secondaire est largement étudié. De petits apports de Ca^{2+} cytosolique enclenchent une série de réponses cellulaires, comme la production des ROS et la synthèse de phytoalexines. Une augmentation du Ca^{2+} a été détectée dans des cellules de tabac après traitement avec différents éliciteurs (Chandra et Low, 1997) ou chez la dolique lors de l'interaction incompatible avec le champignon *Uromyces vignae* (Xu et Heath 1998). Des canaux calciques membranaires impliqués dans le processus d'élicitation ont été caractérisés chez la tomate et le persil (Gelli *et al.*, 1997 ; Zimmermann *et al.*, 1997). L'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques, d'agents chélateurs ou l'omission de Ca^{2+} dans le milieu de cultures cellulaires permet de bloquer la transduction du signal (Nürnberg *et al.*, 1994 ; Romeis *et al.*, 1999 ; Tavernier *et al.*, 1995). Au contraire, l'utilisation d'ionophores ou l'addition de Ca^{2+} dans le milieu de cultures cellulaires stimule l'expression de réponse de défense (Tavernier *et al.*, 1995). Enfin, beaucoup d'effets de l'ion Ca^{2+} s'exercent par le truchement d'une petite protéine du cytosol, la calmoduline, présente dans toutes les cellules eucaryotes, qui semble importante pour la régulation et le stockage du calcium lors des réponses de défense (Grant et Mansfield, 1999). Le niveau de calmoduline est augmenté chez la tomate après blessure ou après traitement avec la systémine ou l'acide jasmonique (AJ) (Bergey et Ryan 1999). L'expression constitutive du gène de la calmoduline chez le tabac provoque une induction spontanée de lésions et induit l'expression de gènes typiques de la SAR,

indépendamment de l'AS (Heo *et al.*, 1999). Les phosphatases et les kinases sont réputées pour leur sensibilité au complexe calmoduline•Ca²⁺ (Grant et Mansfield, 1999). Cet événement associant Ca²⁺ et kinase, est l'un des nombreux exemples dans lequel deux messagers secondaires interagissent pour ajuster de façon précise certains enchaînements de la régulation cellulaire (Figure 5).

3. 3. Phosphorylation et déphosphorylation des protéines

Les protéines kinases transfèrent le phosphoryle terminal de l'ATP à des résidus sérine, thréonine ou tyrosine des protéines acceptrices. Les phosphatases éliminent le groupement phosphate de ces mêmes acides aminés. Les formes phosphorylées de beaucoup d'enzymes sont singulièrement plus actives que leurs formes non phosphorylées ; par contre, pour d'autres enzymes, la forme phosphorylée est la moins active. La séquence des phosphorylations et déphosphorylations des protéines constitue une cascade ou série d'étape dans laquelle la protéine catalysant une étape est chaque fois activée (ou inhibée) par le produit de la réaction précédente. La phosphorylation des protéines participent à la régulation de très nombreux phénomènes aussi bien dans le règne animal que végétal (Hunter, 1995 ; Hardie, 1999).

Chez les plantes, les étapes de phosphorylation et déphosphorylation sont essentielles dans les phases précoces et tardives de la signalisation conduisant aux réponses de défense et la mort cellulaire (Yang *et al.*, 1997 ; Hirt, 2000 ; Ren *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 1999). Leur importance dans la signalisation a été démontrée dans de nombreuses études par l'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases (Raz et Fluhr, 1993 ; Levine *et al.*, 1994 ; Viard *et al.*, 1994 ; Suzuki *et al.*, 1999) ou d'inhibiteurs de phosphatases (Raz et Fluhr, 1993 ; Levine *et al.*, 1994). L'inhibition des protéines kinases empêche la production de ROS, la production d'éthylène, l'activité PAL et la mort cellulaire après un traitement par un éliciteur (Chandra et Low, 1995 ; Felix *et al.*, 1991 ; Grosskopf *et al.*, 1990 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Suzuki *et al.*, 1999). L'utilisation des inhibiteurs de phosphatase peut induire des réponses de défense en absence d'éliciteurs (Levine *et al.*, 1994).

Plusieurs gènes de résistance codent pour des protéines comportant un domaine sérine / thréonine kinase, comme la protéine codée par le gène *Xa21* chez le riz et la protéine codée par le gène *Pto* chez la tomate (Wang *et al.*, 1998 ; Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Sessa et Martin, 2000 ; Martin, 1999). Quand un ligand s'attache à ce type de récepteur, il en stimule l'activité kinase du domaine cytosolique de ce

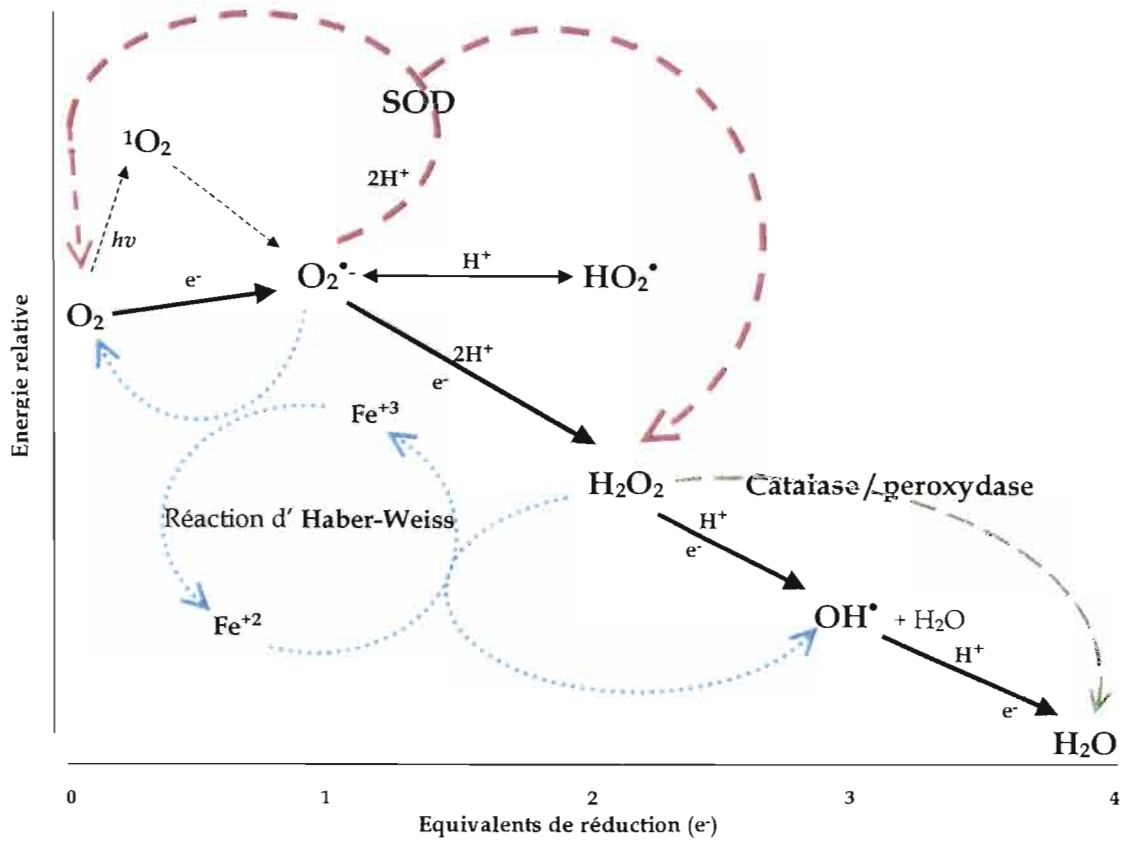
récepteur qui précipite alors une cascade de transduction de signaux aptes à changer la physiologie de la cellule et/ou le profil d'expression des gènes. Grâce au système double hybride de levure, il a été mis en évidence qu'au cours de l'interaction *Pto/AvrPto* aboutissant à la RH, des protéines interagissant avec la protéine kinase Pto: Pti1, une sérine/thréonine kinase codée par *Pti1* (Pto-interacting 1) est spécifiquement phosphorylée par Pto (Zhou *et al.*, 1995 ; Sessa et Martin, 2000 ; Bogdanove et Martin, 2000). Pti 4 qui serait potentiellement un facteur de transcription est également phosphorylée par Pto (Gu *et al.*, 2000). Pti5 et Pti6 sont des protéines qui se lient aux séquences *cis*-élément des promoteurs de gènes de protéines PR basiques (Zhou *et al.*, 1997 ; Bogdanove et Martin, 2000) (Figure 2). Ainsi, la surexpression de *Pto* chez la tomate induit des réponses de défense et de mort cellulaire en absence d'interaction entre Pto et AvrPto (Tang, *et al.*, 1999). Romeis *et al.*, (2000) ont montré qu'au cours de l'interaction *Avr9 / Cf9* une protéine kinase dépendante du calcium (CDPK) était induite 5 minutes après mise en contact avec l'éliciteur. Cet exemple montre que les étapes de phosphorylation peuvent relier directement les événements de reconnaissance à l'induction de réponses de défense.

On a identifié certaines MAP kinases qui interviennent dans différentes voies de signalisation en réponse aux blessures, aux éliciteurs et aux agents pathogènes (Felix *et al.*, 1991 ; Hirt, 2000 ; Ligterink, 2000 ; Cardinale *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2001). Chez le tabac, les SIP kinases (Salicylic acid-Induced Protein kinases) et les WIP kinases (Wounding-Induced Protein kinases), sont activées suite au traitement par la cryptogéine, par la harpigne et par le produit du gène *Avr9* de *C. fulvum* (Zhang et Klessig, 1997 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Romeis, *et al.*, 1999 ; Romeis *et al.*, 2000 ; Adam *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 2001). L'activation de ces kinases est dépendante d'une forte concentration en calcium cytosolique et en calmoduline, mais elle n'est pas nécessaire à la production de ROS (Romeis, *et al.*, 1999, 2000). La SIP kinase est activée au niveau post-traductionnel, alors que l'activation de WIP kinases est transcriptionnelle et post-traductionnelle (Zhang et Klessig, 1998). Des arguments génétiques et biochimiques viennent confirmer l'importance de cette voie de signalisation dans l'induction de la RH au cours de l'interaction incompatible (Zhang *et al.*, 2000 ; Ren *et al.*, 2002).

3. 4. Les formes réactives de l'oxygène

L'oxygène, symbole de la vie, est à l'origine des ROS formées par sa réduction séquentielle. Ces ROS incluent principalement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'anion

A



B

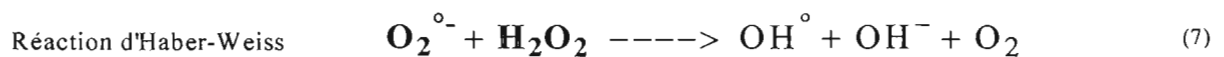
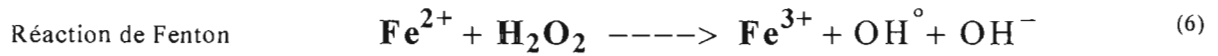
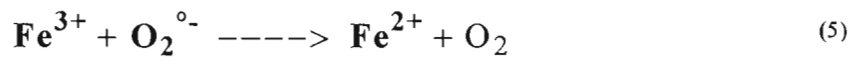
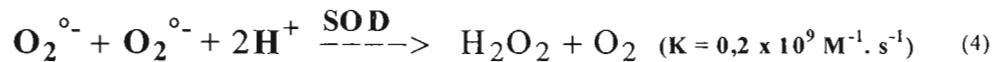
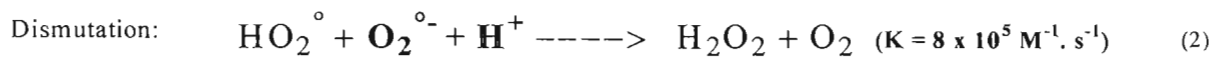


Figure 7 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (d'après Baker et Orlandi, 1995).

A : Réactions d'interconversion.

B : Equations chimiques associées aux ROS.

superoxyde (O_2°), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH°). Dans la littérature, différents termes sont utilisés : Espèces Actives de l'oxygène (Active Oxygen Species, AOS), Espèces Réduites d'Oxygène (Reduced Oxygen Species, ROS) Intermédiaires Actifs d'Oxygène (Active Oxygen Intermediates, AOI), Oxygène Actif (Active Oxygen, AO), Intermédiaires Réactifs d'Oxygène (Reactive Oxygen Intermediates, ROI), ou encore Espèces Réactive d'Oxygène, (**Reactive Oxygen Species, ROS**). Toutes ces descriptions reflètent la complexité et les potentialités diverses de ces molécules. Pour désigner ces composés, nous utiliserons l'abréviation **ROS** ou le terme **radicaux libres**, bien qu'il ne s'agisse pas uniquement de radicaux du point de vue chimique. Les ROS sont produites en faible quantité au cours du métabolisme normal de tout organisme aérobie par le système de transport d'électrons tels les chloroplastes (photosynthèse) et les mitochondries (respiration) ou lors de processus enzymatiques (Del Rio *et al.*, 1992 ; Asada, 1994 ; Allen, 1995). Elles sont utiles à l'organisme à doses modérées, mais toxiques à haute dose. L'organisme va alors se protéger par divers systèmes antioxydants enzymatiques (SOD, catalase, peroxydase, glutathion transférase) ou non enzymatiques en produisant de l'acide ascorbique et/ou du glutathion (Foyer, 1993). Dans ce sens, le rôle des glucosyltransférases a été récemment étudié (Chong *et al.*, 1999). L'équilibre entre la production et l'élimination des ROS constitue le stress oxydant, très largement documenté dans les interactions plantes /pathogènes (Lamb et Dixon, 1997 ; Low et Merida, 1996 ; Wojtaszek, 1997). Dans certaines circonstances particulières que nous détaillerons ultérieurement, ces formes très réactives s'accumulent et peuvent être à l'origine de nombreux événements qui aboutissent à l'altération de l'architecture cellulaire, voire à la mort. Cet aspect néfaste fait cependant trop souvent oublier le rôle joué par les ROS dans la signalisation cellulaire.

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

L'oxygène représente aujourd'hui 21% de l'atmosphère terrestre. Les végétaux chlorophylliens, terrestres ou aquatiques, assurent sa production à partir de la molécule d'eau, tout les organismes vivants utilisent cet oxygène dans un processus de production d'énergie au cours de la respiration. En effet, la formation de molécules hautement énergétiques comme l'ATP est fortement liée à une chaîne de transporteurs qui transfère des électrons de molécules biologiques réduites vers un

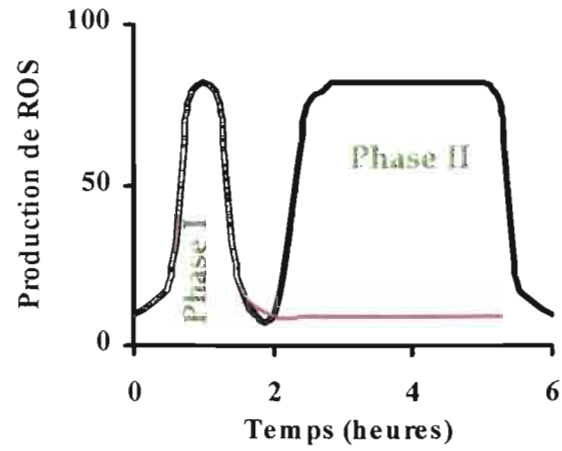


Figure 8 : Schéma représentant la production de ROS lors d'une interaction incompatible ou compatible. Les courbes en traits noir et rouge représentent respectivement une situation incompatible et une situation compatible (d'après Baker *et al.*, 1993).

accepteur final : l'oxygène. Pourtant, une réduction incomplète de l'oxygène moléculaire est possible (Figure 7). L'oxygène moléculaire est relativement non toxique et non réactif, sa réduction séquentielle mono-électronique conduit à la formation des ROS. Les ROS, ou les radicaux libres, sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possède un électron célibataire (ou non apparié). Le champ magnétique créé par sa rotation n'est donc pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules produisant de nouveaux radicaux libres de type peroxydasique extrêmement réactifs. Le radical hydroxyle est généré par une réaction non enzymatique, la réaction de Haber-Weiss, qui fait intervenir des métaux de transition tels que le Fe^{2+} , Cu^+ (Figure 7). Les ROS sont produits par un grand nombre de mécanismes programmés par l'organisme à des fins de défense ou de signalisation.

La production des ROS a été mise en évidence pour la première fois par Doke (1983a,b) lors de la RH sur des tissus de tubercule de pomme de terre infectés par une race incompatible de *P. infestans*. Depuis, de nombreuses études ont montré que les ROS sont induites par des agents pathogènes (Martinez *et al.*, 1998 ; Mehdy, 1994 ; Wojtaszek, 1997 ; Simon-Plas *et al.*, 1997) ainsi que par des éliciteurs de toute nature (Lamb et Dixon, 1997 ; May *et al.*, 1996 ; Pugin *et al.*, 1997). L'évolution de la cinétique de production de ROS après la mise en contact de cellules végétales avec un microorganisme pathogène est différente selon qu'il s'agisse d'une interaction compatible ou incompatible. Dans le cas de l'interaction compatible, une production transitoire de ROS peut avoir lieu quelques minutes après le contact des deux partenaires (appelée phase I) suivie d'une baisse irréversible. Dans le cas de l'interaction incompatible, deux phases ont été observées : une première phase identique à celle de l'interaction compatible est suivie quelques heures plus tard d'une deuxième phase de production de ROS (appelée phase II) (Figure 8). La deuxième phase est caractéristique des situations incompatibles, elle coïncide avec un phénomène d'échange d'ions à travers la membrane cytoplasmique notamment un efflux d'ions K^+ et un influx d'ions H^+ et conduit à la mort cellulaire quelques heures plus tard (Baker *et al.*, 1993 ; Chandra *et al.*, 1996b ; Levine *et al.*, 1994 ; Keppler *et al.*, 1989 ; Draper, 1997). La phase I de production de ROS est non spécifique. Par contre, la phase II nécessite l'action des gènes *hrp* dans la résistance non-hôte et l'action des gènes *Avr* dans la résistance spécifique race/cultivar (Glazener *et al.*, 1996, Lamb et Dixon, 1997). Dans des suspensions cellulaires de tomate infectées par

Ps. syringae pv. *tomato*, la phase II de production de ROS est induite uniquement lorsque *Pto* et *AvrPto* sont présents dans les organismes correspondants (Chandra *et al.*, 1996b). La phase II du burst oxydatif semble donc reliée au phénomène de résistance.

Plusieurs enzymes sont aptes à générer les ROS au cours des interactions plantes/pathogènes (Bolwell et Wojtaszek, 1997) soit en tant qu'intermédiaire dans une suite de réactions, soit en tant que produit final de réactions contrôlées par les NAD(P)H-oxydases, glucose oxydases, oxalate oxydases ou certaines peroxydases. Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont montré l'activation du complexe de la NAD(P)H oxydase capable d'utiliser de l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d' O_2^\cdot au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules végétales (Keller *et al.*, 1998 ; Groom *et al.*, 1996). Sur différents modèles, des protéines végétales sont reconnues par des anticorps dirigés soit contre des sous-unités régulatrices du complexe oxydase des neutrophiles humains comme p47^{phox} (**phox** pour le terme de « **phagocyte oxydase** »), p67^{phox} (Dwyer *et al.*, 1996 ; Desikan *et al.*, 1996) ou une petite protéine G (Rac 2) (Kieffer *et al.*, 1997), soit contre une sous-unité constitutive de ce complexe (p22^{phox}) (Levine *et al.*, 1994). Les gènes codant pour des homologues à la sous-unité gp91^{phox} de NADPH oxydases de mammifères ont maintenant été clonés chez le riz et *Arabidopsis* (Groom *et al.*, 1996 ; Keller *et al.*, 1998). Ces résultats, ajoutés aux parentés immunologiques entre les systèmes d'oxydases dans les neutrophiles et les cellules de plantes, suggèrent une similarité entre les mammifères et les plantes dans les processus de défense contre les microorganismes pathogènes (Levine *et al.*, 1994 ; Groom *et al.*, 1996). L'inhibition de l'activité des NAD(P)H oxydases par un inhibiteur suicide des NAD(P)H oxydases de mammifères comme le diphénylène iodonium (DPI) empêche la production des ROS après élicitation dans plusieurs systèmes végétaux (Bolwell *et al.*, 1998 ; Levine *et al.*, 1994 ; Simon-Plas *et al.*, 1997). Les ROS sont aussi produites par des peroxydases pariétales (Bolwell et Wojtaszek, 1997). Ainsi, des cotylédons de cotonniers infectés par une race incompatible de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*) génèrent un burst oxydatif extracellulaire grâce à une NADH peroxydase cationique apoplastique (Martinez *et al.*, 1998). Cependant, sur des cellules de haricot, une partie de la production de H_2O_2 induite par un éliciteur issu de *Colletotrichum lindemuthianum* est inhibée par la présence de cyanure de potassium (KCN) alors que les NADPH oxydases sont insensibles à ce composé (Lamb et Dixon, 1997). Sur le même matériel végétal, il a été mis en évidence une peroxydase cationique de 46 KDa

localisée dans la paroi des cellules capables de produire H₂O₂ (Bolwell *et al.*, 1995). Il faut également signaler qu'il existe d'autres systèmes de production des ROS comme chez l'orge où une oxalate oxydase est responsable de la production de H₂O₂ (Wotjaszek, 1997). Enfin, une lipoxygénase a aussi été proposée comme producteur des ROS (Roy *et al.*, 1994), mais il a été récemment mis en évidence que l'activation de cette enzyme est postérieure à la production des ROS (Rosahl, 1996).

3.4.2. Transduction du signal conduisant au « burst oxydatif »

L'activation du burst oxydatif semble être sous le contrôle de plusieurs éléments de la cascade de transduction du signal (Low et Merida, 1996 ; Mehdy *et al.*, 1996 ; Bolwell, 1999). L'implication de kinases et de phosphatases est maintenant bien établie (Radjasehar *et al.*, 1999 ; Viard *et al.*, 1994). Le calcium est aussi un élément nécessaire à la production des ROS dans plusieurs cultures cellulaires traitées avec des éliciteurs (Chandra et Low, 1997 ; Grant et Loake, 2000) sauf pour la suspension cellulaire de tabac traitée avec la harpigne (Chandra et Low, 1997). L'implication de phospholipases A et C (Chandra *et al.*, 1996 ; Low et Merida, 1996 ; Legendre *et al.*, 1993), de protéines G (Gelli *et al.*, 1997 ; Kieffer *et al.*, 1997 ; Ono, *et al.*, 2001 ; Vera-Estrella *et al.*, 1994) en amont de la production des ROS a été démontrée.

3.4.3. Rôle des ROS dans la signalisation

Actuellement, le rôle des ROS en tant que messagers secondaires dans l'activation de gènes de défense est largement étudié. Cependant, les résultats obtenus sont très contradictoires et semblent dépendre des systèmes végétaux utilisés, du type de réponses de défense activées, et de la nature des ROS générées. H₂O₂, qui est la forme la plus stable des ROS, semble impliqué dans l'activation de LOX chez la lentille (Maccarrone *et al.*, 2000), l'induction de la synthèse de l'AS chez le cotonnier (Martinez *et al.*, 2000), de la synthèse des phytoalexines chez le haricot (Mehdy *et al.*, 1996), mais pas chez le soja (Levine *et al.*, 1994) ou le tabac (Rustérucci *et al.*, 1996). L'addition de H₂O₂ à des cultures cellulaires de soja provoque une accumulation des transcrits de la glutathion-S-transferase au même titre que l'addition d'une souche incompatible de *Ps. syringae* pv. *glycinea* (Levine *et al.*, 1994, 1996). Sur les axes hypotylés de soja, la synthèse des glycéollines est induite par l'application de H₂O₂ (Cornille, 1997). Ainsi, un choc thermique sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* induit une forte augmentation transitoire du calcium cytoplasmique par un influx qui est mimé par l'application d'H₂O₂ (Knight *et al.*,

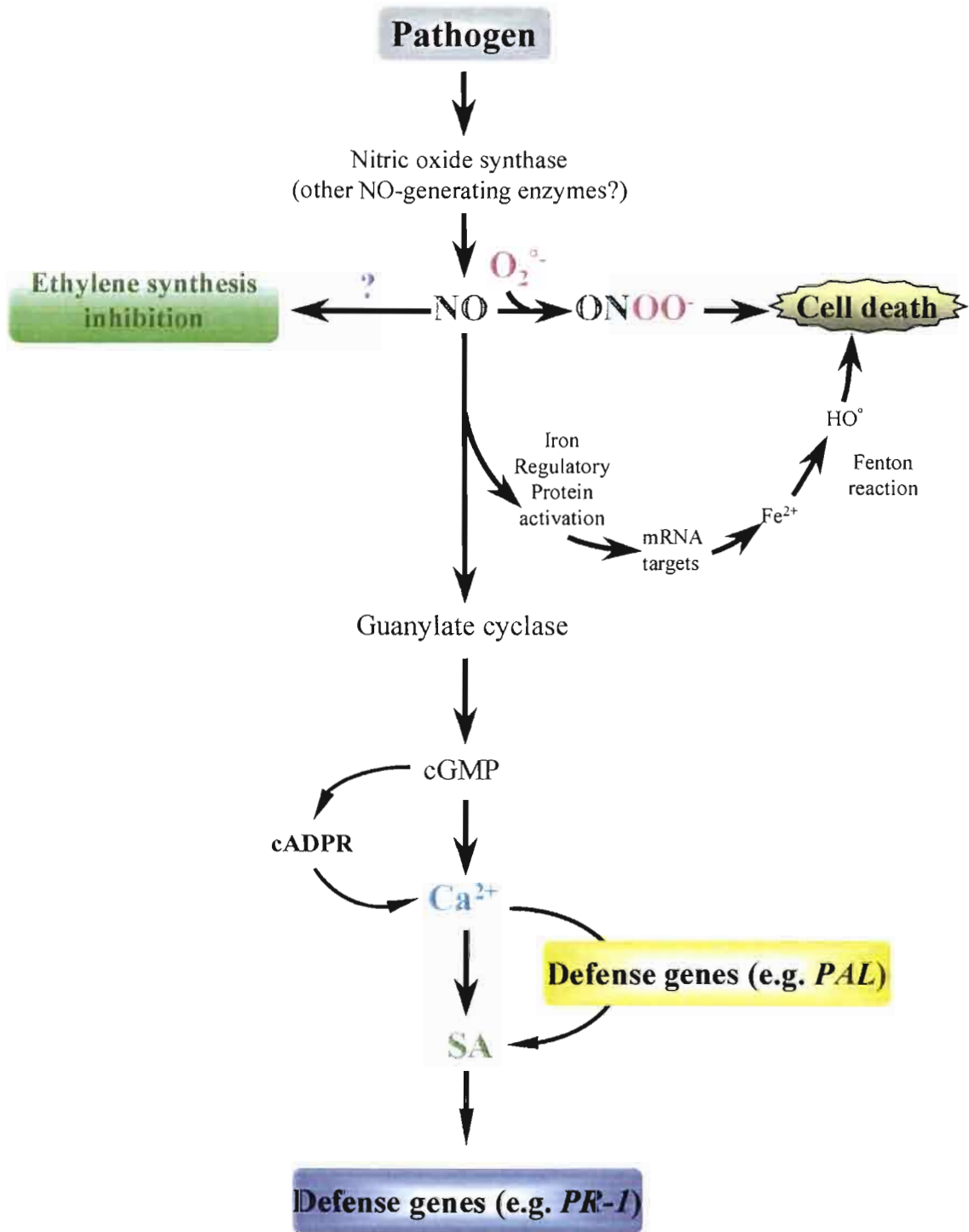


Figure 9: Modèle hypothétique du rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la transduction du signal au cours de la résistance des plantes (Wendehenne *et al.*, 2001). Le NO pourrait avoir un rôle direct dans l'induction précoce et tardive de gènes de défense, comme les gènes de la *PAL* et les gènes des protéines *PR-1*, respectivement. Mais, en réagissant avec certaines formes réactives de l'oxygène ou en activant la production des ROS, il aurait un rôle anti-microbien direct et participerait à l'induction de la mort cellulaire.

cADPR, ADP-ribose cyclique ; cGMP, GMP cyclique ; *PAL*, phénylanine ammonia lyase ; ONOO⁻, peroxy-nitrite ; *PR-1*, pathogenesis-related protéine-1.

1996). De même, sur des plantes de tabac traités par H_2O_2 , l'accumulation du calcium dans le cytoplasme est accentuée en présence d'inhibiteur de l'ascorbate peroxydase ou de la synthèse du glutathion. Cette accumulation est inhibée en présence d'un antagoniste du calcium, le lanthane (Price *et al.*, 1994). H_2O_2 serait aussi impliqué dans l'induction de la synthèse des PR protéines (Chamnonpol *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 1997). De manière intéressante, une étude sur des cellules de tomates montre que l'accumulation de transcrits codant les extensines est déclenchée par H_2O_2 ou par $O_2^{\circ-}$ (Cornille, 1997). Ainsi, $O_2^{\circ-}$ (et non H_2O_2) est nécessaire et suffisant pour induire l'accumulation de phytoalexines chez le persil (Jabs *et al.*, 1997). L'ensemble de ces travaux montre que les ROS jouent un rôle important dans la signalisation et l'induction de certaines réponses de défense.

3. 5. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est une autre espèce radicalaire produite, à des fins de médiation physiologique, par des systèmes enzymatiques que sont les NOS (Nitric Oxide Synthase). Il est maintenant bien établi que le NO est une molécule signal impliquée dans la réponse immune chez les mammifères (Mayer et Hemmens, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2001). Tout récemment, le rôle du NO dans les réponses de défense des plantes a été mis en évidence chez *Arabidopsis* et le tabac (Delledonne *et al.*, 1998 ; Durner *et al.*, 1998 ; 2001). L'activité NOS est stimulée au cours de l'interaction incompatible tabac/VMT (Durner *et al.*, 1998). De plus, l'application exogène de NO ou de la NOS induit la synthèse de protéines PR et l'expression de la PAL chez le tabac. L'activation de ces gènes de défense par le NO implique le GMPc et le ribose ADPc (Durner *et al.*, 1998 ; Wendehenne *et al.*, 2001), des molécules aussi caractérisées dans la voie de transduction NO-dépendante chez les animaux. Les rôles potentiels du NO dans la RH sont présentés dans la figure 9 (Bolwell, 1999 ; Durner et Klessig, 1999).

Chez *Arabidopsis*, le NO potentialise la mort cellulaire hypersensible induite par les autres formes de ROS (en particulier H_2O_2) (Delledonne *et al.*, 1998). Par contre, NO et H_2O_2 semblent contrôler séparément l'expression de gènes codant pour des enzymes typiques de défense telle que la PAL ou la chalcone synthase (CHS) et des gènes codant pour des enzymes antioxydantes comme la glutathion-S-transférase. En outre, l'inhibition de la synthèse de NO entraîne, chez *Arabidopsis*, une perte de la résistance à la bactérie *Ps. syringae*. L'utilisation de piègeurs de NO chez la pomme de terre suggère qu'il joue également un rôle d'antioxydant contre l'effet cytotoxique

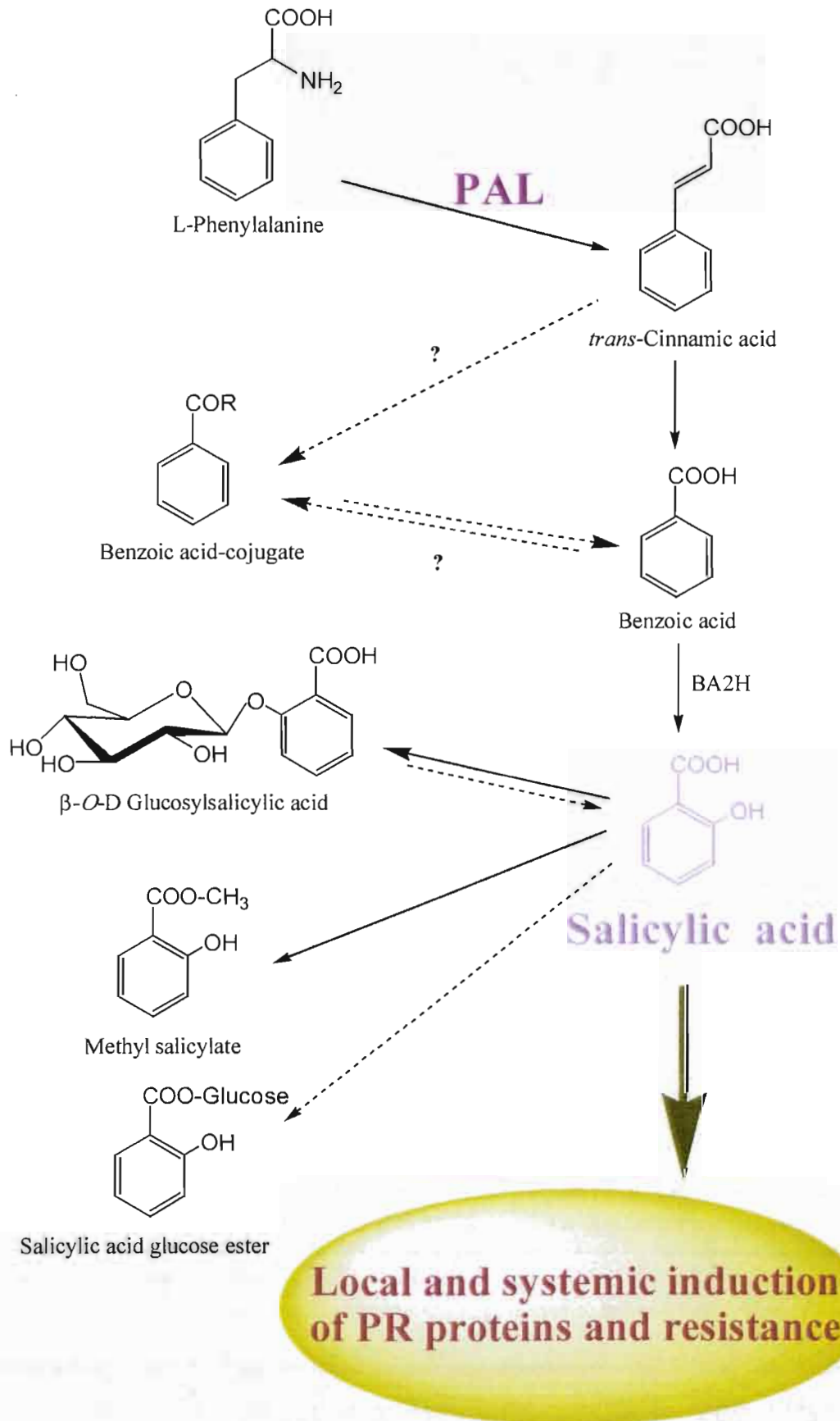


Figure 10 : Voie métaboliques de l'acide salicylique (d'après Lee *et al.*, 1995).
 BA2H, benzoic acid 2-hydroxylase ; PAL, phenylalanine ammonia lyase.

d'autres formes de ROS (Beligni et Lamattina, 1999). Enfin, une autre étude démontre que le NO en combinaison avec l'AS et des ROS exogènes est capable d'induire la mort cellulaire (Delledonne *et al.*, 1998).

4. Transduction du signal intercellulaire

La SAR est induite à la suite d'une RH déclenchée en réponse à l'infection par un agent pathogène. Elle peut persister pendant plusieurs semaines. Elle est exprimée au niveau de la plante entière et lui permet de résister non seulement vis-à-vis de l'agresseur d'origine, mais aussi vis-à-vis d'une large gamme d'autres parasites. Le développement d'une résistance systémique au niveau des tissus non infectés dépend d'un réseau élaboré de communications intercellulaires qui coordonne le métabolisme cellulaire. Ce sont alors des molécules messagères extracellulaires qui servent de signal ; ces substances spécifiques libérées par les cellules exprimant une RH, diffusent et atteignent d'autres cellules qui déclenchent une réponse spécifique. L'AS et l'éthylène, ainsi que l'AJ ou la systémine ont été reconnus depuis plusieurs années comme des messagers chimiques alertant les cellules non infectées et réglant leur métabolisme vers une résistance. Ces mêmes signaux seraient impliqués dans la signalisation LAR (Dorey *et al.*, 1997).

4. 1. L'acide salicylique

L'acide salicylique (AS), un composé phénolique issu de la voie des phénylpropanoïdes et considéré comme une phytohormone (Figure 10), joue un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes, en particulier lors de la résistance locale et la SAR (Dempsey *et al.*, 1999 ; Durner *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1995). Il a été montré que la production de l'AS augmente localement et de manière systémique après infection par différents types d'agents pathogènes (Malamy *et al.*, 1990, Métraux *et al.*, 1990 ; Rasmussen *et al.*, 1991 ; Martinez *et al.*, 2000). Cette production d'AS est très souvent corrélée à l'expression de protéines PR. De même, l'application exogène d'AS à des plants de tabac et d'*Arabidopsis* entraîne l'expression d'une proportion importante de protéines PR stimulées lors de la SAR (Uknes *et al.*, 1993 ; Ward *et al.*, 1991), l'activation de certaines LOX chez l'orge et *Arabidopsis* (Weichert *et al.*, 1999 ; Schenk *et al.*, 2000) et de peroxydases chez le cotonnier (Martinez *et al.*, 2000)

On a longtemps cru que l'AS était le signal qui migrerait du site d'infection vers les autres parties de la plante où il induisait les réactions de défense permettant

l'acquisition de la résistance systémique. S'il reste indiscutable que l'AS joue un rôle majeur dans le développement de la SAR, on se pose, encore aujourd'hui, la question de savoir si l'AS est le facteur mobile déclenchant la généralisation de la résistance dans la plante (Klessig et Malamy, 1994 ; Dong, 1995 ; Durner *et al.*, 1997). Toutefois, Shulaev *et al.* (1995) ont montré que l'AS, marqué par $^{18}\text{O}_2$, est réellement véhiculé dans la plante par le phloème. La forte implication d'AS dans la résistance locale et dans la SAR a été démontrée par la génération des plants de tabac et d'*Arabidopsis* exprimant le gène *nahG* de *Pseudomonas putida* qui code pour une salicylate hydroxylase (Delaney *et al.*, 1994 ; Gaffney *et al.*, 1993). Cette enzyme catalyse la dégradation d'AS en catéchol (un phénol sans activité inductrice). Les plants de tabac transgéniques exprimant l'enzyme montrent une très faible induction des gènes PR et sont incapables de développer une SAR lors d'une infection secondaire, ce qui se traduit par des lésions de plus grande taille (Gaffney *et al.*, 1993). Les plantes d'*Arabidopsis* exprimant le même gène *nahG* sont également incapables d'exprimer une SAR (Delaney *et al.*, 1994). De plus, ces plantes sont plus sensibles à une infection primaire par un pathogène normalement avirulent. L'inhibition de la PAL rend des plants d'*Arabidopsis* sensibles à une souche avirulente de *Peronospora parasitica*. La résistance est restaurée par application exogène d'AS (Mauch-Mani et Slusarenko, 1996). Récemment, une autre approche confirmant l'implication d'AS dans l'induction des réponses de défense et de la SAR, a consisté à surproduire l'AS de manière constitutive chez le tabac (Verberne *et al.*, 2000). L'expression constitutive de deux enzymes bactériennes dans les chloroplastes permet la conversion du chorismate en SA. Ces tabacs transgéniques, sans phénotype particulier, montrent une accumulation de l'AS 500 à 1000 fois supérieure à celle des tabacs sauvages et expriment constitutivement plusieurs protéines PR acides, associée à une résistance constitutive à une infection virale ou fongique.

L'AS méthylé (MeSA), produit à partir d'AS lors d'infection, peut conduire à l'expression de gènes de défense via une reconversion en SA (Seskar *et al.*, 1998 ; Shulaev *et al.*, 1997). Il a été proposé que cette molécule volatile pouvait induire les réactions de défense par voie aérienne (Shulaev *et al.*, 1997).

La relation entre l'AS et les ROS a été mise en évidence par Chen *et al.* (1993, 1995) qui isolèrent une protéine fixant l'AS avec une forte affinité. Cette protéine est une catalase, une enzyme qui catalyse la dégradation du H_2O_2 . L'AS serait donc impliqué dans l'inhibition de la dégradation de H_2O_2 produit lors du choc oxydatif, favorisant ainsi toutes les réactions de défense dépendantes de la concentration de

H₂O₂. Il est à remarquer que des autres inducteurs de la SAR, l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) et Benzothiadiazole (BTH, un analogue fonctionnel d'AS), inhibent également la catalase (Conrath *et al.*, 1995 ; Wendehenne *et al.*, 1998). Ainsi, il a été montré que l'AS, le BTH et l'INA inhibent l'activité de l'ascorbate peroxydase, une autre enzyme impliquée dans la dégradation de H₂O₂ (Durner et Klessig, 1996 ; Wendehenne *et al.*, 1998). L'action inhibitrice de l'AS sur la catalase est confortée par le fait que des plantes de tabac transgéniques, modifiées par un ARN antisens de catalase, donc moins riches en catalase et plus riches en H₂O₂, expriment PR-1 de façon constitutive. Récemment, une protéine de 25 kd ayant une forte affinité avec l'AS a été purifiée chez le tabac, mais son rôle dans la défense des plantes reste à clarifier (Du et Klessig, 1997). Ainsi, des travaux récents ont montré que l'AS en combinaison avec la canthridine (un inhibiteur de phosphatase) est suffisant pour provoquer la production de ROS sur une culture cellulaire de soja en absence de parasite (Shirasu *et al.*, 1997). Cependant, aucune diminution de l'activité catalase n'a été détectée dans la résistance locale avec RH chez le tabac ou *Arabidopsis* (Bi *et al.*, 1995 ; Summermatter *et al.*, 1995). En outre, bien que H₂O₂ induise l'expression des gènes PR-1 dans des feuilles de tabacs sauvages, il est inefficace sur des plantes NahG (Bi *et al.*, 1995 ; Neuenschwander *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent que l'augmentation des niveaux de H₂O₂, qui résulterait de l'inhibition des catalases, ne permet pas l'activation directe des gènes de protéines PR, mais que celle-ci se fait via l'AS, en aval de H₂O₂. Dans ce sens, Martinez *et al.* (2000) ont montré que H₂O₂ induisait l'accumulation locale de l'AS lors d'une infection du cotonnier par une race incompatible de *Xcm*.

L'AS pourrait aussi intervenir localement dans le processus de mort cellulaire hypersensible. Bloquer l'accumulation précoce d'AS lors de l'interaction incompatible tabac/VMT a retardé l'apparition de la mort cellulaire (Mur *et al.*, 1997). L'AS est nécessaire au processus de mort cellulaire induit par une race avirulente de *Ps. syringae* pv. *glycinea* chez le soja (Tenhaken et Rübel, 1997). Chez certains mutants *lsd* d'*Arabidopsis*, l'accumulation de l'AS est indispensable à l'apparition de nécroses (Hunt *et al.*, 1997 ; Weymann *et al.*, 1995). Des mutants d'*Arabidopsis acd6* (accelerated cell death) présentent des niveaux élevés de réponse de défense et une résistance accrue à *Ps. syringae*. Or, lorsque ces mutants sont incapables de produire l'AS (mutants *nahG-acd6*), ils ne présentent plus de phénotype « *acd6* » (Rate *et al.*, 1999). L'interaction entre l'AS et les catalases ou les ascorbate-peroxydases permettrait de générer des radicaux libres (SA[•]) (Durner et Klessig, 1996 ; Kvaratskhelia *et al.*, 1997)

capables d'entraîner une peroxydation lipidique pouvant conduire à la mort des cellules végétales (Keppler et Baker, 1989). En outre, ces peroxydes lipidiques sont susceptibles d'intervenir dans l'induction, par l'AS, du gène de défense PR-1 (Anderson *et al.*, 1997).

4.2. L'éthylène

L'éthylène, dérivé de la méthionine, semble aussi fortement impliqué dans la voie de transduction du signal. Cette hormone volatile est impliquée dans plusieurs processus physiologiques et notamment dans la résistance des plantes (Ecker, 1995). Les niveaux d'éthylène augmentent dans les cellules végétales lors de l'infection par des agents pathogènes ou après traitements avec des éliciteurs (Grosskopf *et al.*, 1991 ; Sticher *et al.*, 1997). Selon l'espèce végétale, l'éthylène peut stimuler des enzymes des voies de biosynthèse de la lignine et des phytoalexines.

La voie de transduction de l'éthylène est relativement bien définie, notamment grâce à l'étude de nombreux mutants d'*Arabidopsis* (Chang et Shockey, 1999 ; Stepanova et Ecker, 2000). Elle fait intervenir des récepteurs de type hétérodimère histidine kinase. Récemment, il a été montré que la protéine ETR1 joue le rôle de récepteur de l'éthylène avec un domaine à activité kinase nécessitant du cuivre comme cofacteur (Stepanova et Ecker, 2000). On trouve en aval la protéine CTR1, un régulateur des réponses à l'éthylène, qui appartient à la famille des MAP-kinase kinase kinases, ce qui suggère l'intervention d'une cascade de MAP kinases. Les réponses de défense seraient alors activées *via* des facteurs de transcription.

Cependant, le rôle de l'éthylène dans la résistance est controversé. Par exemple, le mutant *ein-1* d'*Arabidopsis*, insensible à l'éthylène, est toujours résistant à une souche avirulente de *Ps. syringae* (Bent *et al.*, 1992). De même, des plants de tabac transformés avec le gène *etr1-1* d'*Arabidopsis*, conférant aussi l'insensibilité à l'éthylène, sont toujours résistants au VMT (Knoester *et al.*, 1998). Par contre ces mêmes tabacs deviennent sensibles à l'infection par des micro-organismes fongiques du sol (Knoester *et al.*, 1998).

L'ambiguïté du rôle de l'éthylène dans la défense est renforcée par le fait qu'il régule la réponse de sensibilité à des agents pathogènes virulents. Par exemple, des mutants de tomate qui ne peuvent plus percevoir l'éthylène sont moins sensibles à des bactéries et des champignons virulents (Lund *et al.*, 1998). Chez le mutant *ein-2* d'*Arabidopsis* insensible à l'éthylène, l'induction de l'expression de la défensine et de la chitinase basique est abolie lors de l'infection par *Alternaria brassicicola* (Thomma *et*

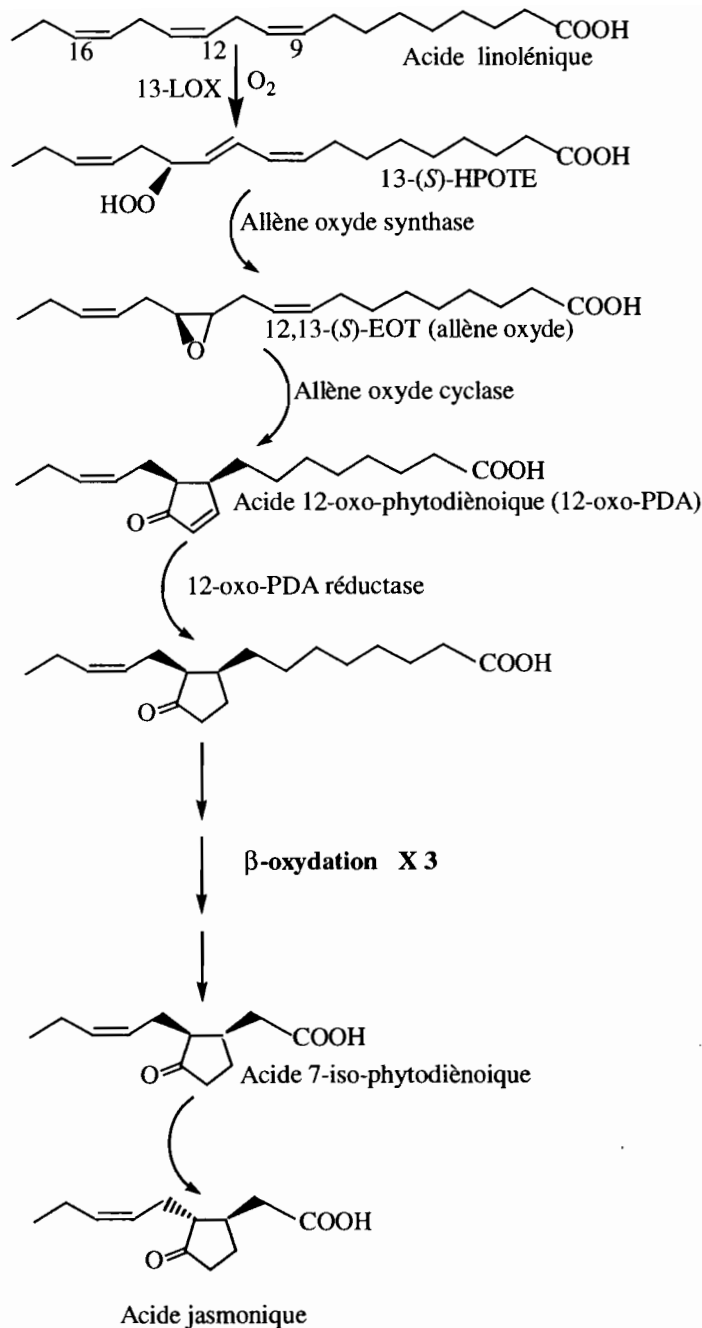


Figure 11 : Biosynthèse de l'acide jasmonique. L'acide jasmonique est un dérivé cyclique produit au cours de la décomposition de 13-(S)-HPOTE par l'action séquentielle de nombreuses enzymes. Les réactions chimiques qui y aboutissent appartiennent à la voie d'allène oxyde synthase. Ainsi, le 12,13 (S)-EOT (allène oxyde) produit à partir d'une activité allène oxyde synthase est cyclisé par l'action d'une allène oxyde cyclase pour donner l'acide (9S-13S)-12-oxo-phytodiénoïque avant de subir trois étapes de β -oxydation (chacune comporte quatre réactions enzymatiques) pour diminuer la longueur de sa chaîne carbonée (d'après Leon et Sanchez-Serrano, 1999; Grechkin, 1998).

al., 1999). Ce mutant est plus sensible à *B. cinera*, mais sa colonisation par les champignons *Pe. parasitica* ou *A. brassicicola* n'est pas favorisée par rapport au type sauvage.

4.3. L'acide jasmonique

Cet acide 12-oxo phytodiénoïque est un dérivé cyclique produit à partir de 13-(S)-hydroperoxyde de l'acide linoléique (C18 :3) par l'action séquentielle de nombreuses enzymes (Figure 11). Ainsi, le 13 (S) hydroperoxyde lipidique produit à partir d'une activité 13-LOX est cyclisé avant de subir trois étapes de β -oxydation pour diminuer la longueur de sa chaîne carbonée (Sembdner et Parthier, 1993 ; Simpson et Gardner, 1995 ; Leon et Sanchez-Serrano, 1999). Cette synthèse est analogue à celle observée chez l'animal, lors de la production des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (C20 :4).

L'AJ et son ester méthylé, le MeJA, une molécule volatile, ne sont pas seulement impliqués dans la croissance et le développement de la plante mais également dans la signalisation aboutissant à des réponses de défense (Wasternack et Parthier, 1997). Il a été montré que l'AJ s'accumule précocement au site d'infection du VMT chez le tabac (Kenton *et al.*, 1999), après blessures chez le tomate (Creelman *et al.*, 1992) ou après traitement des cultures cellulaires de soja et de tabac avec des éliciteurs (Gundlach *et al.*, 1992 ; Rickauer *et al.*, 1997). L'AJ et le MeJA interviennent dans l'expression locale et systémique d'inhibiteurs de protéases dans les feuilles de tomates en réponse à la blessure (Farmer et Ryan, 1990). De plus, l'addition exogène de l'acide jasmonique se traduit par l'activation des gènes codant pour la PAL, la CHS chez des cultures cellulaires de soja et de tabac (Creelman *et al.*, 1992 ; Gundlach *et al.*, 1992 ; Sharan *et al.*, 1998), la production de peptides ou protéines antifongiques défensives chez *Arabidopsis* (Penninckx *et al.*, 1996), l'expression d'une osmotine (PR-5) chez le tabac (Xu *et al.*, 1994), la stimulation de LOX dans plusieurs systèmes végétaux (Avdiushko *et al.*, 1995 ; Melan *et al.*, 1993 ; Véronési *et al.*, 1999 ; Rustérucchi *et al.*, 1999 ; Weichert *et al.*, 1999 ; Schenk *et al.*, 2000) ou la production de H₂O₂ chez la tomate *via* d'une activité NADPH-oxydase (Orozco-Cardenas et Ryan, 1999 ; Orozco-Cardenas *et al.*, 2001). Des mutants d'*Arabidopsis* qui ne peuvent pas accumuler l'AJ sont extrêmement sensibles à l'infection par un *Pythium* (Vijayan *et al.*, 1998). L'application exogène d'AJ permet de réduire significativement cette sensibilité. L'AJ semble donc directement impliqué dans ce cas de défense chez *Arabidopsis*. Le pré-traitement des plants de pomme de terre par l'AJ augmente leur résistance vis-à-vis

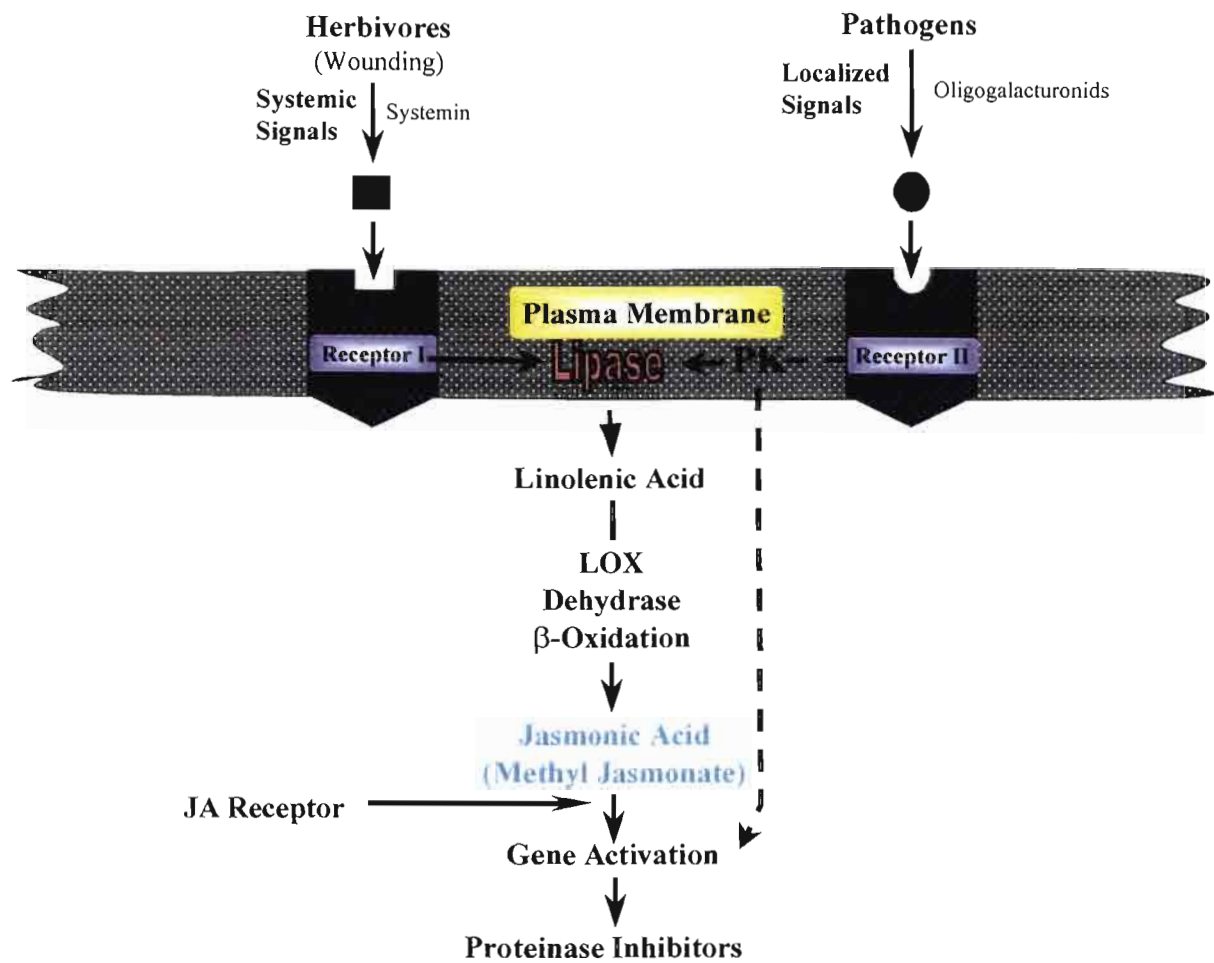


Figure 12 : Modèle de signalisation impliquant l'acide jasmonique dans l'induction des gènes d'inhibiteurs de protéases dans les feuilles de tomates (Farmer et Ryan, 1992).

PK, Protéines Kinases ; LOX, Lipoxygénase ; JA, Acide Jasmonique.

de *P. infestans* (Cohen *et al.*, 1993). Récemment, une autre approche confirmant l'importance de l'AJ dans la résistance a consisté à produire l'AJ de manière constitutive chez *Arabidopsis* (Ellis et Turner, 2001). Ces plantes transgéniques présentent une résistance très efficace à des souches de mildiou. Le rôle de l'AJ et du MeJA comme molécule signal dans la défense semble toutefois dépendre de l'espèce végétale et de la nature des réponses étudiées. Par exemple, chez le riz, l'AJ ne semble pas nécessaire pour l'induction de gènes de protéines PR et l'établissement d'une résistance locale (Schweizer *et al.*, 1997). De plus, des tabacs transgéniques n'exprimant pas la WIP kinase n'accumulent pas d'AJ après blessures, alors qu'une surexpression de cette kinase induit une augmentation du taux endogène d'AJ (Seo *et al.*, 1999). Ceci suggère qu'un mécanisme de phosphorylation est également impliqué dans la voie de signalisation de l'AJ lors de la blessure.

Un modèle impliquant l'AJ et le MeJA dans les réponses à l'attaque par des insectes et des agents pathogènes a été proposé (Figure 12) (Farmer *et al.*, 1992 ; Farmer et Ryan, 1992). La blessure provoquée par un insecte herbivore ou l'infection par un micro-organisme conduirait à la production de molécules spécifiques, telles que la systémine ou des oligogalacturoïdes pariétaux qui activeraient une lipase. Cette lipase libérerait de la membrane plasmique de l'acide linoléique qui serait converti en AJ via des LOX. L'AJ stimulerait ensuite l'expression des gènes de défense. Des phospholipases sont effectivement activées après élicitation de suspensions cellulaires de soja (Chandra *et al.*, 1996a) ou de tabac (Roy *et al.*, 1995), et après blessures chez *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2000). Une enzyme avec une activité phospholipase A2 a été isolée chez le tabac infecté par le VMT (Dhont *et al.*, 2000). Une forte stimulation de cette activité phospholipase précède une augmentation des quantités d'AJ. Récemment, Seo *et al.* (2001) ont isolé chez *Arabidopsis* un gène codant pour une JMT (*S*-adenosyl-L-méthionine : jasmonic acid carboxyl methyltransferase), enzyme qui catalyse la transformation de l'AJ en MeJA. Cette étude montre, en utilisant des plants transgéniques d'*Arabidopsis* surproduisant du MeJA, que la JMT joue un rôle essentiel dans la régulation des réponses spécifiques aux microorganismes. Ces plantes montrent une résistance très efficace vis-à-vis des souches virulentes de *B. cinerea*. Ce travail suggère que l'activation de l'expression de JMT conduit à la production de MeJA qui réagit comme régulateur intra- et inter-cellulaire, et comme messenger volatile assurant la communication intra- et inter-plantes.

4.4. Autres signaux

Les ROS

Le peroxyde d'hydrogène est une molécule très diffusible et peut donc déclencher à distance une réaction de défense (Levine *et al.*, 1994). Cette molécule est considérée comme l'un des meilleurs candidats pour représenter un messager intercellulaire induisant la mort cellulaire et la SAR. En effet, l'infection des plantes d'*Arabidopsis* par une souche avirulente de *Ps. Syringae* provoque la formation, dans les feuilles saines, de microlésions localisées (Alvarez *et al.*, 1998). La formation de ces microlésions reliée à l'établissement de la SAR dépend du « burst oxydatif » qui a lieu au site d'infection ainsi que de « micro-burst oxydatifs » produits dans les feuilles non infectées. Ce travail suggère pour la première fois que les ROS peuvent être impliquées à tous les stades de la résistance.

La systémine

La systémine est un peptide de 18 acides aminés, transportée par le phloème, responsable de l'induction locale et systémique, chez la tomate et la pomme de terre, de gènes de réponse à la blessure. Ceux-ci sont induits par des insectes herbivores et codent pour des inhibiteurs de protéases (Bisseling, 1999 ; Schaller, 1999). Son rôle a été confirmé à l'aide de tomates transgéniques exprimant en antisens le gène de la prosystémine (une protéine de 200 acides aminés), le précurseur de la systémine, qui développent plus de réponse systémique à la blessure (McGurl *et al.*, 1992). La systémine favorise les flux d'ions, ainsi qu'une augmentation de l'activité d'une enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène sur suspension cellulaire de persil (Felix et Boller, 1995). Elle induit un burst oxydatif au niveau de la blessure mais aussi dans les feuilles supérieures (Orozco-Cardenas et Ryan, 1999). La surexpression de la prosystémine chez la tomate transgénique conduit à une expression constitutive des inhibiteurs de protéases en absence de blessure (McGurl *et al.*, 1994). Cependant, aujourd'hui, on ne sait pas si l'expression de la systémine est induite au cours de la RH ou si elle est limitée à la réponse à la blessure.

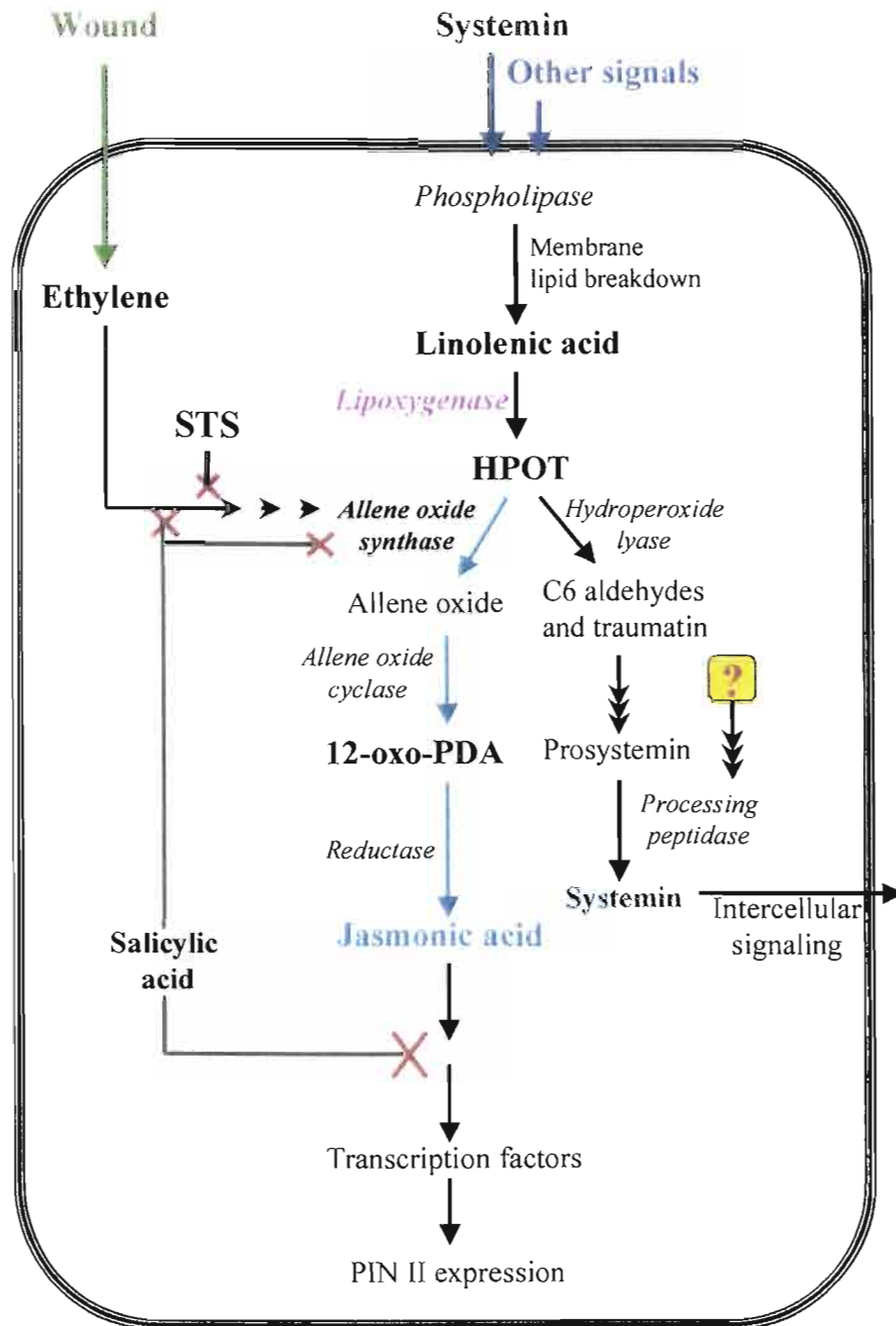


Figure 13 : Modèle proposé pour l'activation de gènes de défense chez la tomate *via* la voie du JA (Sivasankar *et al.*, 2000).

Les blessures, la systémine et d'autres signaux agissent sur une phospholipase pour libérer les acides gras qui sont les substrats pour des lipoxygénases. Les hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique par l'action de la 13-lipoxygénase sont utilisés par l'allène oxyde synthase (AOS) pour produire l'acide 12-oxo-phytodiénoïque et l'acide jasmonique. Le JA et le PDA activent l'expression des gènes de défense (PIN II). L'induction de la prosystèmeine *via* des aldéhydes de courte chaîne (C6) conduit à la synthèse de systèmeine qui peut agir comme un signal intercellulaire systémique. L'éthylène produit en réponse aux blessures induit l'allène oxyde synthase. Le JA et l'éthylène sont nécessaires pour une expression maximale de PIN II. L'acide salicylique inhibe l'effet de l'éthylène sur l'induction de AOS, inhibe l'expression de AOS et inhibe l'action de la voie du jasmonate dans l'induction des gènes de défense.

STS : "silvar thiosulfate".

5. Interconnexion des différentes voies de signalisation

5.1. Phénomène de potentialisation

Le phénomène de potentialisation est un exemple de coopération dans les systèmes de signalisation. Il y a potentialisation lorsqu'un ou plusieurs signaux affectent positivement (en cinétique et en magnitude) l'expression de réponses de défense induite par un signal primaire. Par exemple, l'éthylène potentialise l'induction par l'AS de l'expression du gène PR-1 chez *Arabidopsis* (Lawton *et al.*, 1994). De nombreux travaux ont montré que l'AS lui-même joue un rôle dans la potentialisation de réponses de défense après élicitation (Kauss et Jeblick, 1995 ; Kauss *et al.*, 1992 ; Mur *et al.*, 1996). Chez le soja, de très faibles concentrations en AS stimulent l'expression de gènes de défense (PAL et glutathion-S-transférase), l'accumulation de H₂O₂ et la mort cellulaire après infection par la bactérie avirulente *Ps. syringae* pv. *glycinea* (Shirasu *et al.*, 1997). Ces concentrations en AS sont cependant trop faibles pour induire seules ces réponses de défense. Chez le persil, l'AS à faible concentration aurait un rôle dans la potentialisation de certaines réponses de défense et dans l'induction directe d'autres gènes de défense comme certaines peroxydases (Thulke et Conrath, 1998). Toujours chez le persil, des effets du BTH seraient très similaires (Katz *et al.*, 1998).

5.2. Relations entre l'acide salicylique, le jasmonate et l'éthylène

Il apparaît clairement aujourd'hui que les voies de signalisation peuvent être inter-reliées (Bostock, 1999 ; Dong, 1998 ; Glazebrook, 1999 ; Reymond et Farmer, 1998). Dans certains cas, les signaux agissent par antagonisme (Figure 13). Par exemple, l'AS bloque la biosynthèse de l'AJ chez la tomate (Doares *et al.*, 1995 ; Pena-Cortes *et al.*, 1993) ou contrôle négativement l'expression de gènes régulés par l'AJ (Doares *et al.*, 1995 ; Gupta *et al.*, 2000) et par l'éthylène (Gu *et al.*, 2000). Inversement, il peut y avoir également inhibition de l'action d'AS par l'AJ (Bostock, 1999 ; Sano et Ohashi, 1995). Dans d'autres cas, les signaux agissent en synergie pour activer des réponses de défense. Par exemple, dans des plantules de tabac, l'induction de l'expression des gènes PR-1 et PR-5 est plus importante lorsque du MeJA et de l'éthylène sont appliqués en combinaison (Xu *et al.*, 1994). Chez *Arabidopsis*, l'expression d'une défensine nécessite à la fois l'action de l'éthylène et de l'AJ, mais est indépendante d'AS (Dong, 1998 ; Penninckx *et al.*, 1996, 1998).

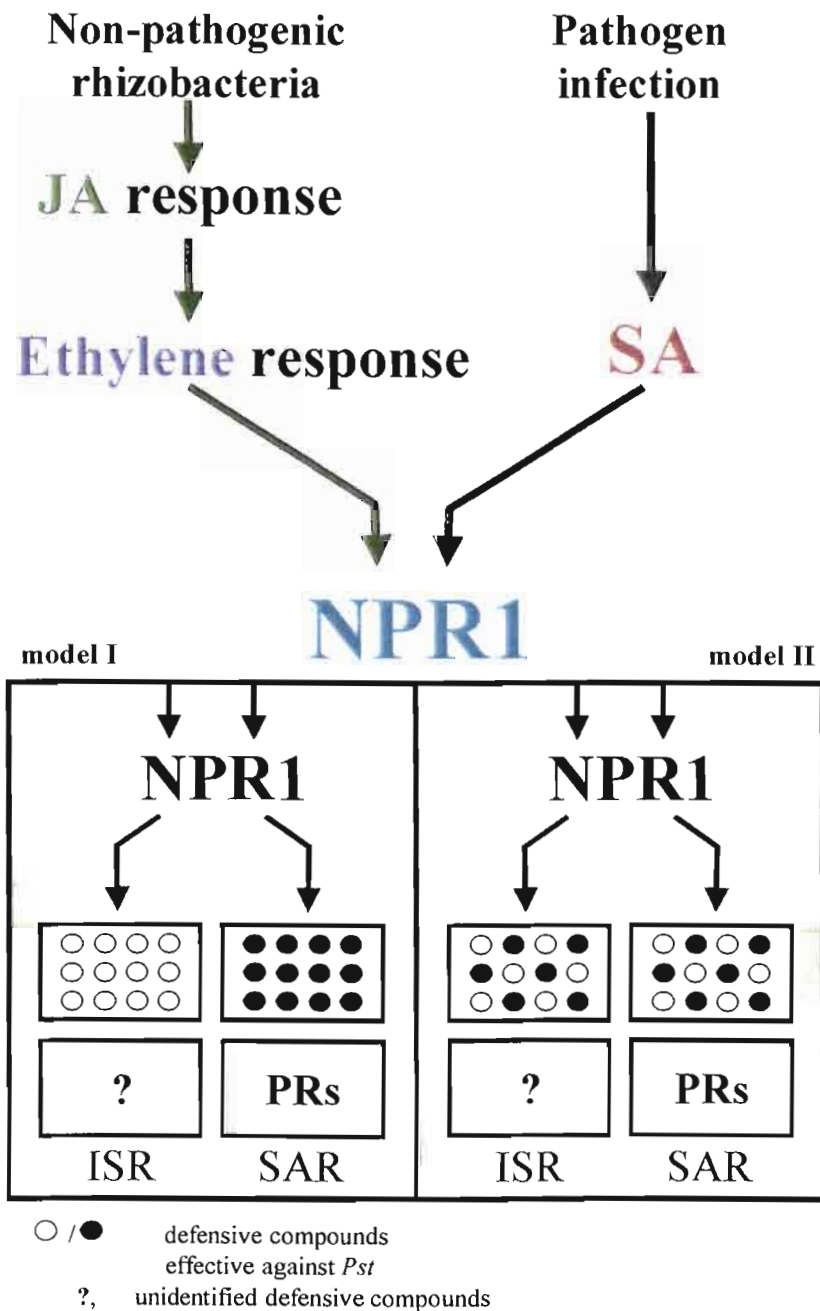


Figure 14: Modèle pour l'augmentation du niveau de résistance induite contre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* chez les plantes d'*Arabidopsis* exprimant simultanément la SAR et l'ISR (Van Wees *et al.*, 2000).

L'activation simultanée de la SAR et de l'ISR conduit à un effet additif sur le niveau de défense contre *Ps. syringae* pv. *tomato*. Cet effet n'est pas accompagné d'une augmentation de l'expression du gène *Npr1*. L'augmentation du niveau de résistance induite peut être due à une activation parallèle de plusieurs réponses de défense encore non-identifiées qui sont toutes efficaces contre *Ps. syringae* pv. *tomato*. L'effet complémentaire sur le niveau de protection peut être réalisé soit *via* la synthèse de produits de gènes antibactériens distincts (modèle I), soit *via* une synthèse en plus grande quantité des produits de gènes antibactériens identiques (modèle II). Dans les deux cas, l'induction simultanée de la SAR et de l'ISR conduit à une augmentation du niveau des produits défensifs qui sont actifs contre *Ps. syringae* pv. *tomato*.

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

5. 3. Rôle prépondérant de la protéine NPR1

La protéine NPR1 semble jouer un rôle prépondérant dans la régulation des mécanismes de défense. Des constructions de doubles mutants à partir du mutant *npr1* ont été décrites chez *Arabidopsis*. La mutation *sni1* (suppresseur of *npr1*-inducible) toucherait une protéine SNI1 qui interviendrait comme régulateur négatif de la transcription des gènes de défense, à l'inverse de la protéine NPR1 (Li *et al.*, 1999). La mutation *ssi1* (supress SA-insensitive phenotype) restaure le phénotype sauvage chez le mutant *npr1*, mais affecte la voie de signalisation de l'AJ (Shah *et al.*, 1999). La protéine NPR1 agirait donc comme un élément clé situé au carrefour de plusieurs voies de signalisation conduisant chacune à un sous-ensemble de réactions.

Enfin, des travaux récents ont montré qu'il pouvait y avoir une augmentation du niveau de protection contre un parasite à travers l'activation concomitante et complémentaire de réponses de défense (Figure 14). Chez *A. thaliana*, la SAR et l'ISR sont efficaces contre un large spectre de pathogènes bactériens ou fongiques. L'induction de l'ISR n'affecte pas l'expression du marqueur PR-1 spécifique de la SAR et le niveau constitutif de NPR1, molécule qui régule à la fois la SAR et l'ISR (Van Wees *et al.*, 2000). Une activation simultanée de la SAR et de l'ISR a pour résultat un effet additif sur le niveau de protection induite contre *Ps. syringae*.

Il semble que la production de molécules messagères par la plante pour activer ou induire ses mécanismes de défense dépende de l'étape de reconnaissance ou d'une étape intermédiaire entre la phase de détermination et la phase d'expression de la résistance. En fonction de l'agent pathogène qui l'agresse, la plante va favoriser

une voie de signalisation essentielle pour induire l'expression de plusieurs gènes : un état de résistance qui diminue la sensibilité des cellules à l'infection s'installe. Mais les autres messagers pourront jouer un rôle secondaire en potentialisant ou en renforçant les réponses de défense. L'induction de la résistance nécessite des programmes complexes et des signaux précis pour que toutes les cellules de l'organisme coopèrent au bon fonctionnement de l'ensemble. Cependant, les interactions et les régulations de ces voies de signalisation les unes par rapport aux autres dans l'induction de la résistance ne sont pas encore totalement connues.

6. La mort cellulaire hypersensible

Chez la plante, il existe un programme de mort cellulaire qui, réprimé dans les conditions normales, est induit sous l'effet d'une stimulation par un organisme pathogène. La mort cellulaire de type hypersensible se manifeste phénotypiquement par l'apparition de lésions nécrotiques localisées aux sites de pénétration de l'agent pathogène. Les travaux de ces dernières années présentent des arguments qui suggèrent que la mort cellulaire de type hypersensible est génétiquement programmée (Greenberg, 1996, 1997 ; Morel et Dangl, 1997). La RH nécessite la transcription de gènes et la traduction de gènes spécifiques démontrant qu'elle résulte d'un processus actif contrôlé génétiquement, et pas nécessairement de dommages dus à l'agent pathogène. L'expression de certains transgènes conduit, dans certains cas, à l'induction d'une mort cellulaire semblable à celle de la RH. Par exemple, la surproduction chez le tabac de la protéine Pto (une protéine impliquée dans la voie de signalisation chez la tomate) provoque une amplification de la RH.

Plusieurs classes de mutants d'*Arabidopsis* présentent spontanément des lésions de mort cellulaire semblables aux lésions RH en absence de toute infection (Dangl *et al.*, 1996 ; Dietrich *et al.*, 1994 ; Greenberg *et al.*, 1994). L'identification des mutants *lsd* (lesion stimulating disease resistance response) (Dietrich *et al.*, 1994) et des mutants *acd* (accelerated cell death) (Greenberg *et al.*, 1994) d'*A. thaliana*, présentant spontanément des plages nécrotiques semblables à des RH sur toute la plante, milite en faveur de la présence d'une mort cellulaire génétiquement contrôlée. Chez ces mutants, il semblerait que l'étape de reconnaissance/stimulation ait été court-circuitée. Les réactions de défense sont déclenchées par une dérégulation d'une étape ne dépendant que de la plante. Dès que cette étape est franchie, la suite du programme de mort cellulaire est enclenchée et les lésions apparaissent. Bien que la mort soit souvent une réponse de défense observée dans les interactions

plante/microorganisme pathogène, son rôle dans la résistance n'est cependant pas encore très clair. Récemment, une étude a montré que des mutants *dnd1* (defense, no death) d'*A. thaliana*, ayant des flux de cations K^+ et Ca^{2+} perturbés, sont incapables d'activer la mort cellulaire hypersensible (Clough *et al.*, 2000). Cependant, ils sont toujours résistants à l'infection par une souche avirulente de *Ps. syringae*. En fait, ces mutants *dnd1* possèdent un niveau très élevé d'AS et expriment de manière constitutive des protéines PR. L'expression du gène *nahG* dans ces mutants *dnd1* entraîne la perte de la résistance vis-à-vis des souches virulentes ou avirulentes de *Pseudomonas* sans développer une mort cellulaire hypersensible. Ce travail montre que la mort cellulaire hypersensible n'est pas nécessaire au processus de résistance race/cultivar et suggère, en revanche, que l'expression des réponses de défense est suffisante pour que cette résistance s'établisse. Les travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui sur le suicide cellulaire ont conclu qu'il existe des gènes dont la présence permet le contrôle de la vie et de la mort des cellules. Ces gènes permettent aux cellules de fabriquer des molécules qui interagissent entre elles. Parmi elles, des composés toxiques comme les ROS (Heath, 2000), ainsi que des nucléases et des cystéines ou sérine-protéases sont directement impliquées dans les mécanismes d'exécution du programme de mort cellulaire (Fukuda, 2000 ; Heath, 2000).

L'apoptose de la cellule animale est une forme particulière de mort cellulaire programmée, distincte de la nécrose, au cours de laquelle une cascade d'événements se met en place dans les différents compartiments des cellules pour conduire à des changements structuraux caractéristiques. Lors de l'apoptose, la membrane plasmique s'invagine, le noyau et le cytoplasme se condensent, des corps apoptotiques qui correspondent à des vésicules membranaires contenant des fragments d'acide nucléique se forment, l'ADN se segmente en fragments de grande taille d'environ 50 kb et/ou de petite taille correspondant à la zone internucléosomale (180 à 200 pb) dont l'extrémité 3'OH libre implique l'intervention d'une endonucléase (DNA laddering) (Heath, 1998 ; Greenberg, 1996, 1997 ; Drew *et al.*, 2000). Une ou plusieurs de ces caractéristiques morphologiques apparaissent lors de la RH mise en place par la plante pour confiner l'agent pathogène à son site de pénétration. Ainsi, des protoplastes de tomate traités par un éliciteur lipidique, l'acide arachidonique, qui permet de développer une RH, montrent une fragmentation de l'ADN en multiples éléments dont les extrémités sont 3'OH libres (Greenberg, 1997). De plus, sur des cultures cellulaires de soja ou sur des tissus d'*A. thaliana*, l'infection par des bactéries avirulentes entraîne l'apparition de fragments

d'ADN de grande taille et de formes semblables à des corps apoptotiques (Levine *et al.*, 1996). Une fragmentation de l'ADN nucléaire et l'induction d'endonucléases spécifiques ont aussi été observées dans les cellules de tabac au cours de la RH contre le VMT (Mittler et Lam, 1995). Ainsi, un clivage de l'ADN nucléaire en nucléosomes a été observé au cours de l'interaction incompatible entre la dolique et le champignon *Uromyces vignae*. Enfin, le traitement des plantes de pois par un éliciteur fongique ou par le cyanure de potassium (KCN) favorise la fragmentation de l'ADN (Greenberg, 1997). L'ensemble de ces observations montre que la mort cellulaire de type hypersensible chez les plantes présente certaines caractéristiques de l'apoptose chez les animaux. Il semble qu'il existe des mécanismes similaires qui pourraient gouverner le phénomène de mort cellulaire programmée chez les plantes et les animaux (Ameisen, 1999).

De nombreuses données indiquent que les ROS participent à l'induction de la mort cellulaire tant chez la cellule végétale que chez la cellule animale. Les résultats montrant que les ROS sont impliquées dans la mort cellulaire chez les végétaux sont généralement basés sur des expériences effectuées *in vitro*. Au cours de la RH induite sur des cultures cellulaires de soja infectées par une race avirulente de *Ps. syringae*, le taux de cellules mortes a fortement augmenté lorsque l'accumulation d' H_2O_2 est accrue en présence d'aminotriazole (un inhibiteur de catalase) (Levine *et al.*, 1994). Ainsi, l'addition aux suspensions cellulaires de soja d'un inhibiteur des protéines kinases comme K252A et la staurosporine, bloque entièrement le choc oxydant induit par l'éliciteur Pmg, un glucan issu de champignon *P. megasperma f. sp. glycinea*, mais sans inhiber totalement la mort cellulaire induite par la bactérie avirulente (Levine *et al.*, 1994). De plus, au cours de l'interaction tabac/VMT, la mort cellulaire de type hypersensible est fortement corrélée à une diminution de l'expression d'une ascorbate peroxydase, une enzyme impliquée dans la détoxification des ROS (Mittler *et al.*, 1998). L'implication de ces ROS dans les réactions de défense et de mort cellulaire *in vivo* a été démontrée grâce à des mutants et des plantes transgéniques. Chez *Arabidopsis*, le gène *lsd1* coderait pour une protéine en « doigt de zinc » fonctionnant comme un régulateur négatif de la mort cellulaire végétale (Dietrich *et al.*, 1997). De manière intéressante, les mutants *lsd1* sont incapables de détoxifier O_2^- produit par des feuilles élicitées. L'infiltration de DPI dans ces feuilles permet à nouveau de contrôler la progression de la RH (Jabs *et al.*, 1996). Ces auteurs suggèrent que O_2^- serait l'élément nécessaire au développement de la RH et donc de la mort cellulaire. Ainsi, l'expression d'un transgène codant pour une enzyme

produisant H_2O_2 dans la pomme de terre, induit une résistance à différents microorganismes pathogènes (Wu *et al.*, 1995). Par ailleurs, des plants de tabac n'exprimant plus la catalase Cat1 présentent des lésions nécrotiques de type RH (Chamnonpol *et al.*, 1996). Chez les plantes comme chez les animaux, la mort cellulaire programmée semble donc être associée aux ROS.

Chez les mammifères, des protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) sont fortement impliquées dans la régulation de l'apoptose. La surexpression de Bcl-2 supprime complètement la peroxydation des lipides et protège des lymphocytes d'homme et de souris de l'apoptose induite par l'application des hydroperoxydes lipidiques ou du H_2O_2 (Sandstrom *et al.*, 1995 ; Hockenbery *et al.*, 1993). Ainsi, l'expression d'une protéine de la famille Bcl-2 chez un tabac transgénique inhibe l'établissement de la mort cellulaire induite par VMT, les UVs ou le paraquate (Jones, 2000). De plus, l'expression d'un activateur de l'apoptose (Mitochondria-targeted Bax triggered cell death) chez le tabac induit des lésions semblables aux lésions RH (Jones, 2000). Chez les animaux, les cystéines protéases, encore nommées caspases, sont impliquées dans l'exécution de l'apoptose (Zhang *et al.*, 2000). Une activité de type caspase a été détectée au cours de l'RH de tabac en réponse au VMT (del Pozo et Lam, 1998). Ainsi, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de caspases bloque la RH induite sur tabac par une bactérie pathogène du haricot. Des résultats identiques, récemment obtenus sur des cultures cellulaires de soja, montrent que l'utilisation des inhibiteurs de cystéine-protéases inhibe la mort cellulaire induite par l'application du H_2O_2 ou par une souche avirulente de *Ps. syringae* pv. *glycinea* (Solomon *et al.*, 1999). L'ensemble de ces observations peut indiquer qu'il existe certaines similitudes entre l'apoptose chez les animaux et la mort cellulaire hypersensible chez les végétaux.

La mort cellulaire programmée, que l'on retrouve chez les végétaux lors de la RH, pourrait donc être sous la dépendance de phénomènes d'oxydation responsables de lésions directes de macromolécules biologiques, notamment lors de l'oxydation des lipides.

B. Les phénomènes de peroxydation dans la mort cellulaire.

La réactivité des ROS est très variable selon la nature du radical. Parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, O_2^{\bullet} , tout comme NO^{\bullet} , ne sont pas très réactifs mais constituent des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives (Figure 7), dont la première est H_2O_2 . C'est une forme non radicalaire

de ROS, stable, qui possède un fort pouvoir oxydant mais qui, de façon spontanée, ne réagit que très faiblement avec les molécules organiques. Cette forme active d'oxygène peut diffuser librement à travers les membranes biologiques à l'inverse de $O_2^{\bullet-}$. H_2O_2 est toxique pour les cellules car elle inactive certaines enzymes du cycle de Calvin, cycle qui intervient dans la fixation du carbone de l'air (Foyer, 1993).

En présence de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+), H_2O_2 se décompose en anion hydroxyl (OH^-) et en radical hydroxyle (OH^{\bullet}) selon la réaction de Fenton. Ainsi, la présence simultanée d' $O_2^{\bullet-}$, de H_2O_2 et de métaux de transition permet la décomposition de H_2O_2 en OH^{\bullet} et en O_2 selon la réaction d'Haber-Weiss (voir Figure 7). Le radical hydroxyle est extrêmement réactif, mais il ne peut pas diffuser de son site de production (Del Rio *et al.*, 1992 ; Asada, 1994 ; Allen, 1995 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Ce radical possède un électron non apparié, il capte facilement un électron pour revenir à un état stable, mais il produit de nouveaux radicaux libres de type peroxydasique, extrêmement réactifs, susceptibles d'entraîner, par des réactions en chaîne, de nouvelles espèces radicalaires, instables. Ces radicaux libres "secondaires" sont susceptibles de dégrader par des réactions peroxydatives les molécules biologiques tels les acides nucléiques, les glucides, les protéines et les lipides (Wardman, 1993 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). L'exemple le plus connu de ces réactions est la peroxydation des lipides.

1. Oxydation des protéines

Les protéines sont formées d'un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par la liaison peptidique. Toute modification d'un acide aminé par réaction radicalaire ou oxydative pourra entraîner une modification structurale et donc fonctionnelle : non-reconnaissance d'un ligand par un récepteur, perte d'activité enzymatique, déformation de structures, etc... Les acides aminés, de part de leur structure chimique, possèdent des sensibilités différentes vis-à-vis des radicaux et des oxydants. Les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) comme la cystéine et la méthionine. Leur oxydation donne naissance à des groupements du type disulfide (S-S), sulfénate (SOH), sulfinate (SO_2H) et sulfonate (SO_3H). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont aussi être oxydées et inactivées. Ces oxydations sont néanmoins réversibles. Au contraire, les oxydations résultant de la réaction de H_2O_2 avec les métaux (fer ou cuivre) présents dans certaines

métalloprotéines sont irréversibles et conduisent à la formation d'un intermédiaire très réactif (espèces hypervalentes du fer ou radical hydroxyle). OH^\bullet est le principal radical initiateur des réactions radicalaires en chaîne dans les protéines par arrachement d'un atome d'hydrogène du carbone $\text{C}\alpha$ d'un résidu acide aminé ou du $\text{C}\epsilon$ d'un résidu lysine, d'un groupement thiol d'une cystéine ou du noyau aromatique de la tyrosine. Les protéines peuvent alors subir des ruptures des chaînes polypeptidiques, ou former des dérivés carbonyles et amides. Les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Pompella, 1997 ; Wells *et al.*, 1997).

2. Altération des acides nucléiques

Les molécules d'ADN constituent, en raison de leur taille et de leurs fonctions, une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires. Les modifications observées après action du radical OH^\bullet sont très nombreuses : modification des résidus thymine en thymine glycol et en 5-hydroxyméthyluracile, de la guanine en 8-hydroxyguanine, oxydation du sucre (le déoxyribose) entraînant une coupure des brins. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome. Des liaisons covalentes peuvent aussi s'établir entre l'ADN et des protéines qui lui sont normalement associées comme les histones (Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Pompella, 1997 ; Wells *et al.*, 1997).

3. Oxydation des lipides

L'oxydation des lipides alimentaires est connue depuis longtemps : modification de l'odeur, du goût et des qualités nutritives des aliments. Les lipides des organismes vivants sont particulièrement sensibles à l'oxydation, notamment ceux formés d'acides gras polyinsaturés (comme l'acide linoléique, l'acide linolénique et l'acide arachidonique) dans les membranes cellulaires.

La peroxydation des lipides correspond à l'introduction d'oxygène moléculaire dans des acides gras polyinsaturés (AGPI). Ce phénomène est dû, soit à une réaction non enzymatique (auto-oxydation) initiée par les formes les plus réactives d'oxygène (Winston, 1990), soit à une réaction enzymatique catalysée par des lipoxygénases ou des cyclooxygénases (Brash, 1999). L'oxygénation s'opère sur le carbone central d'une structure de type 1,4 pentadiényle ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$). La peroxydation des lipides commence par le départ d'un atome d'hydrogène d'un AGPI, ce qui forme un

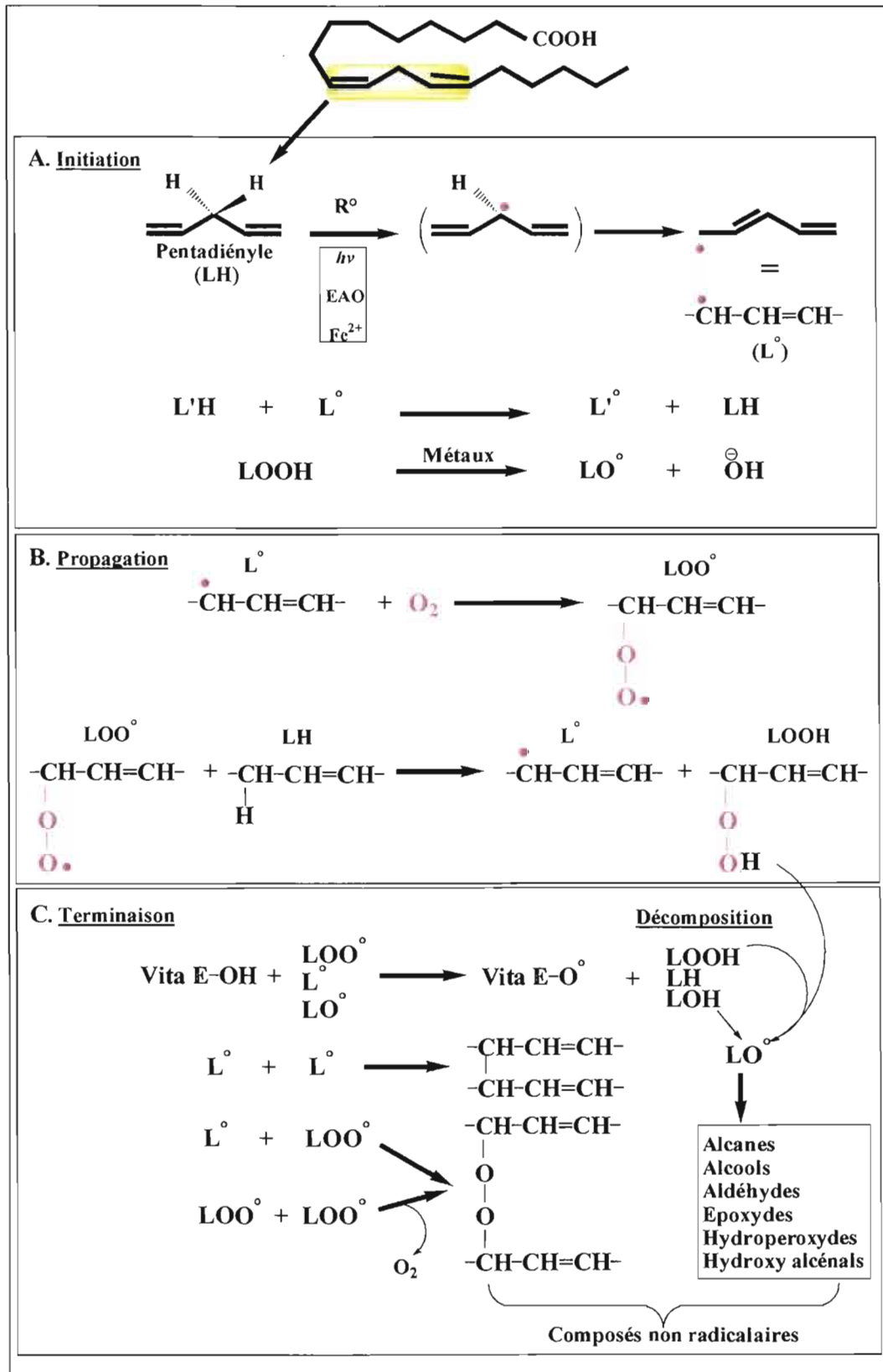


Figure 15 : La peroxydation des lipides (A, B et C) : un mécanisme de réaction en chaîne (d'après Winston, 1990).

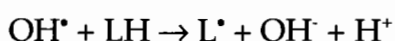
radical lipidique qui se stabilise par réarrangement en un diène conjugué. L'addition d'une molécule d'oxygène forme un hydroperoxyde lipidique (Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Winston, 1990). De nombreux produits sont générés lors de la peroxydation des lipides : diènes conjugués, peroxydes, aldéhydes, alcanes, dont la plupart sont cytotoxiques. La formation de dérivés d'oxydation dans les bicouches lipidiques, plus hydrophiles, entraîne des perturbations de la micro-architecture membranaire et altère les fonctions des enzymes et transporteurs membranaires. De plus, l'autocatalyse de la peroxydation peut aboutir à la formation de concentrations élevées en dérivés d'oxydation qui altèrent la perméabilité membranaire.

3.1. Auto-oxydation

Dans les systèmes biologiques, la réaction d'auto oxydation comporte 3 étapes incluant l'initiation, la propagation et la terminaison (voir Figure 15).

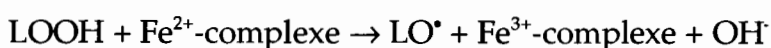
L'initiation

Cette étape de la peroxydation des lipides est dépendante des radicaux libres centrés sur l'oxygène. Sous son état activé, l'oxygène peut soustraire l'atome d'hydrogène présent sur le carbone central d'une structure 1, 4-pentadiényle qui forme le motif bis-allylique élémentaire des AGPI. Seul le radical hydroxyle (OH•) ou des complexes « perferryl » sont capables d'initier la peroxydation des lipides par l'abstraction l'un atome d'hydrogène du groupe méthylène –CH₂–. Le carbone radical se stabilise par réarrangement en un diène conjugué.



La propagation

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



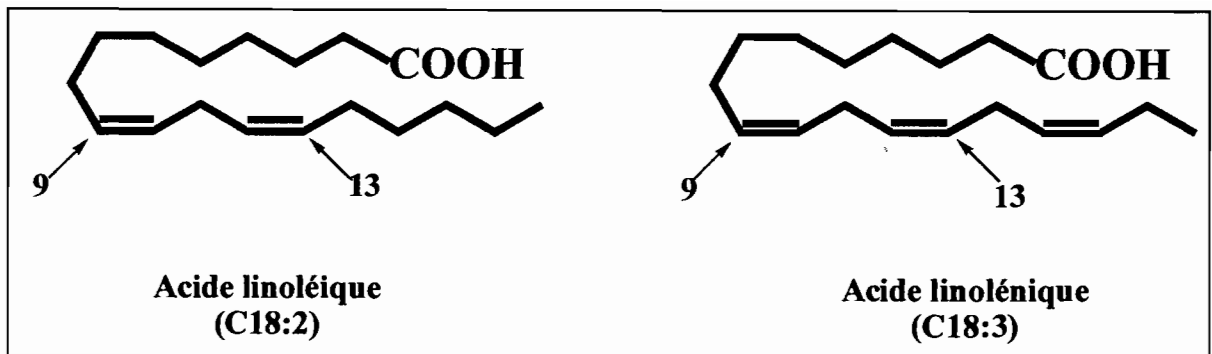
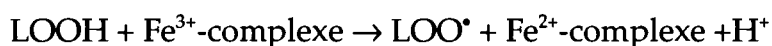


Figure 16 : Schéma de la structure des acides gras polyinsaturés majoritaires chez les végétaux et position des carbones portant la fonction hydroperoxyde.



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

La terminaison

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

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

3. 2. Oxydation enzymatique

L'oxydation enzymatique des acides gras polyinsaturés (AGPI) est réalisée par des dioxygénases à fer comme les cyclooxygénases (COXs) et les lipoxygénases (linoleate :oxygen oxydoréductase, EC 1.13.11.12 ; LOXs) (Brash, 1999 ; Feussner *et al.*, 2001). Ces deux types d'oxygénases sont présents chez les animaux, mais, seules les LOXs ont été caractérisées chez les végétaux. Les LOXs sont largement distribuées aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal. Elles constituent une famille d'oxygénases contenant un fer non hémique qui catalysent la dioxygénation regio- et stéréo-sélective des AGPI possédant la structure 1Z, 4Z pentadiényle, et conduisent à la formation des dérivées hydroperoxydes. Les plantes supérieures possèdent de nombreuses lipoxygénases, huit LOXs sont au moins identifiées et caractérisées chez le soja (Brash, 1999). Ainsi, plusieurs gènes LOX ont été isolés chez de nombreuses plantes (*Arabidopsis*, riz, blé, orge, pomme de terre, tomate, et tabac) (Feussner *et al.*, 2001). Ces gènes codent pour des protéines

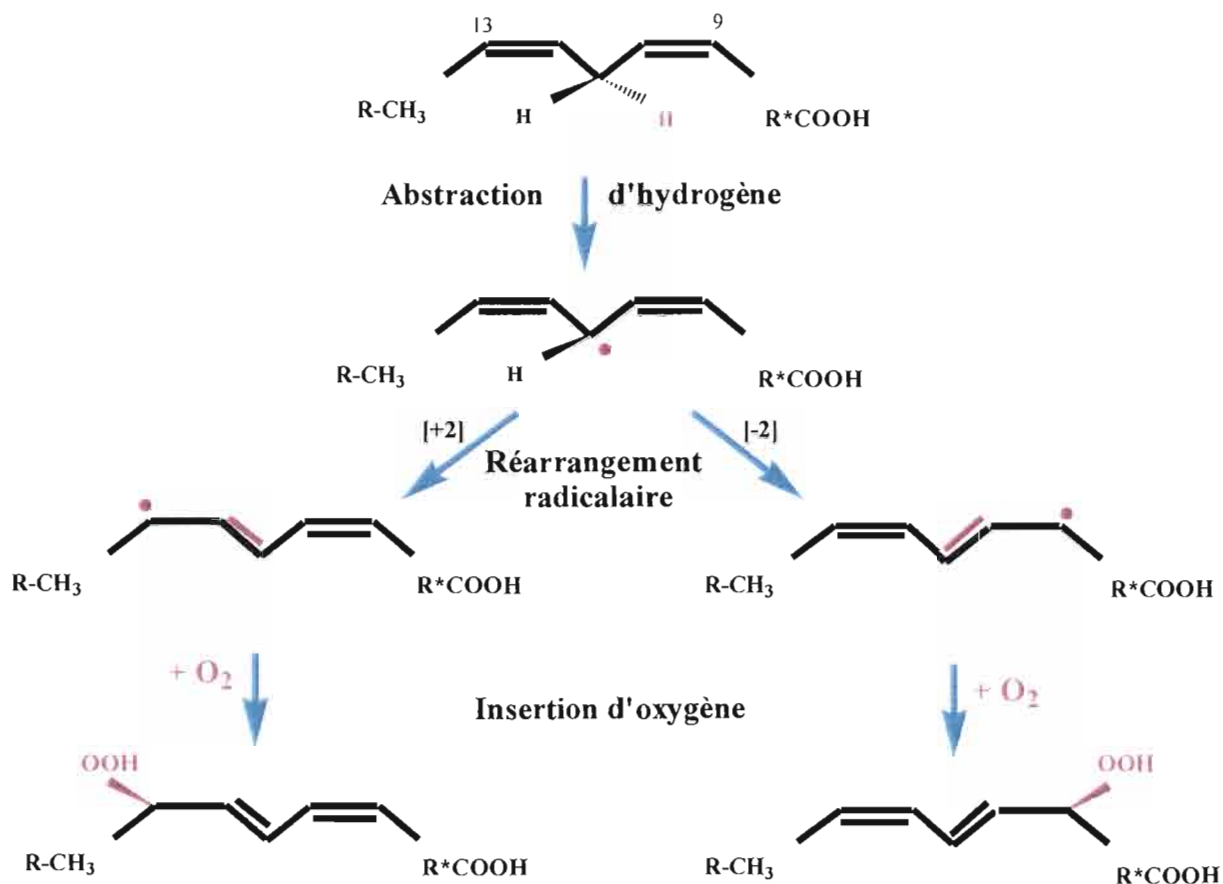
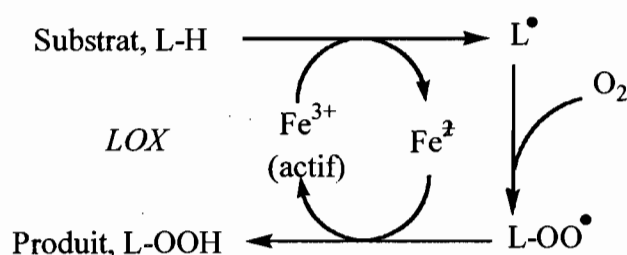


Figure 17 : La conversion de l'acide linoléique en 9-HPODE ou 13-HPODE par l'action de LOX. La formation d'un radical lipidique fait intervenir l'arrachement par la LOX d'un proton du C₁₁ de C18: 2. Le radical lipidique se stabilise par réarrangement en un diène conjugué. L'insertion d'une molécule d'oxygène par l'action de la LOX sur le C₉ ou C₁₃ forme un 9-HPODE ou 13-HPODE, respectivement (Hornung *et al.*, 1999).

caractérisées par une seule chaîne polypeptidique avec une masse moléculaire qui varie entre 94-104 KDa (Brash, 1999).

Le mécanisme de la réaction enzymatique des LOXs est similaire pour les diverses formes de LOX (Brash, 1999 ; Rosahl, 1996). Le fer non hémunique joue le rôle de catalyseur dans cette réaction. Il est inactif sous sa forme Fe^{2+} (réduit) et actif sous la forme Fe^{3+} . La réaction commence par la fixation de l'AGPI au site actif de l'enzyme qui contient le fer sous sa forme Fe^{3+} . Le proton présent sur le carbone central de la structure 1Z, 4Z pentadiényle ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) des AGPI est arraché. Cette réaction produit un radical pentadiényle avec un électron non apparié délocalisé et du Fe^{2+} . L'oxygène moléculaire réagit alors sur le radical pentadiényle pour produire un radical peroxy qui est réduit par l'électron du Fe^{2+} . Il se forme donc un hydroperoxyde et un Fe^{3+} qui permet la restauration de l'activité de l'enzyme (Rosahl, 1996 ; Brash, 1999).



Chez les plantes supérieures, l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linolénique (C18:3) sont les AGPI majoritairement représentés et concernés par la peroxydation. En conséquence, les LOXs sont regroupées en deux classes selon leur spécificité d'incorporation de l'oxygène moléculaire dans ces deux AGPI. La spécificité des LOXs est le résultat de deux processus catalytiques : (1) Regio- et stéréospécificité d'abstraction d'un atome d'hydrogène sur le carbone central (C-11) de la structure 1Z, 4Z pentadiényle de l'AGPI et (2) Regio- et stéréospécificité d'insertion de l'oxygène moléculaire dans ce dernier AGPI (Hornung *et al.*, 1999). L'oxydation se fait donc par l'introduction d' O_2 sur le carbone en position 9 (9-LOX) ou 13 (13-LOX) produisant alors respectivement des 9 ou 13 hydroperoxydes des AGPI C18:2 et C18:3 (voir Figure 16, Figure 17). Le rapport entre les 9 et les 13 hydroperoxydes, ainsi que les contraintes stéréosélectives, diffèrent selon la nature des lipoxygénases. Chez le soja, la LOX-1 produit surtout des 13-hydroperoxydes avec une configuration absolue de type S (90 % contre 10 % pour les 9-hydroperoxydes), alors que la LOX-2 produit autant d'hydroperoxydes en position 13 qu'en position 9 sans stéréosélectivité (Kato *et al.*, 1992). Ainsi, des travaux ont montré que les conditions

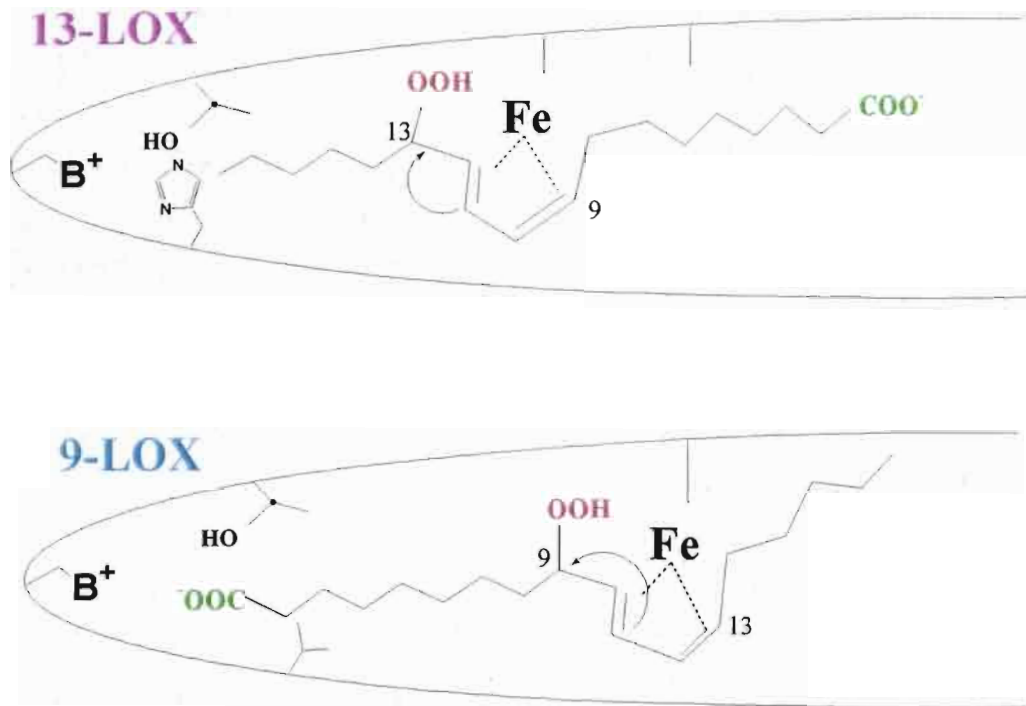


Figure 18 : Schéma représentant l'orientation de l'AGPI dans le site actif de la 13- et 9-LOX (Hornung *et al.*, 1999).

de pH et la concentration en oxygène jouent un rôle crucial dans la spécificité des LOXs (Grechkin, 1998). La LOX-1 de soja, à pH 6 produit 25% de 9-(S)-hydroperoxydes contre 75% de 13-(S)-hydroperoxydes ; alors que plus de 90% de 13-(S)-hydroperoxydes sont formés à pH 9. Aussi, dans des conditions de faible concentration en oxygène, cette LOX perd la régiospécificité et produit un mélange racémique de 9 et 13 hydroperoxydes (Grechkin, 1998). Hornung et ses collaborateurs (1999) montrent élégamment que certaines chaînes latérales d'acides aminés de LOX jouent un rôle crucial en imposant la régiospécificité d'oxydation de l'AGPI. Par mutagenèse dirigée, ces auteurs ont montré que la transformation de 13-LOX de concombre en 9-LOX par remplacement de l'histidine 608 par la valine a modifié la charge et donc l'orientation de l'AGPI dans le site actif de l'enzyme (Figure 18).

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

Ces hydroperoxydes dérivés des acides linoléique et linoléique sont des molécules aliphatiques très réactives qui sont métabolisées rapidement en de nombreux produits de décomposition physiologiquement actifs (Rosahl, 1996 ; Blée et Joyard, 1996). Cette décomposition peut se réaliser sous l'effet de divers éléments physico-chimiques (traces de métaux, chaleur, UV) ou par divers systèmes enzymatiques (peroxygénase, hydroperoxyde lyase, allène oxyde synthase, divinyl ether synthase, LOX) (Voir Figure 19) (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Blée et Joyard, 1996 ; Feussner *et al.*, 2001 ; Grechkin, 1998). Certains de ces produits ont été particulièrement étudiés en raison de leur rôle potentiel dans la transduction de certains signaux (acide jasmonique et 4-hydroxy alcénals) ou de la facilité avec laquelle ils peuvent être analysés (alcanes, aldéhydes). Dans ce dernier cas, leur présence est retenue comme marqueur de la peroxydation des lipides.

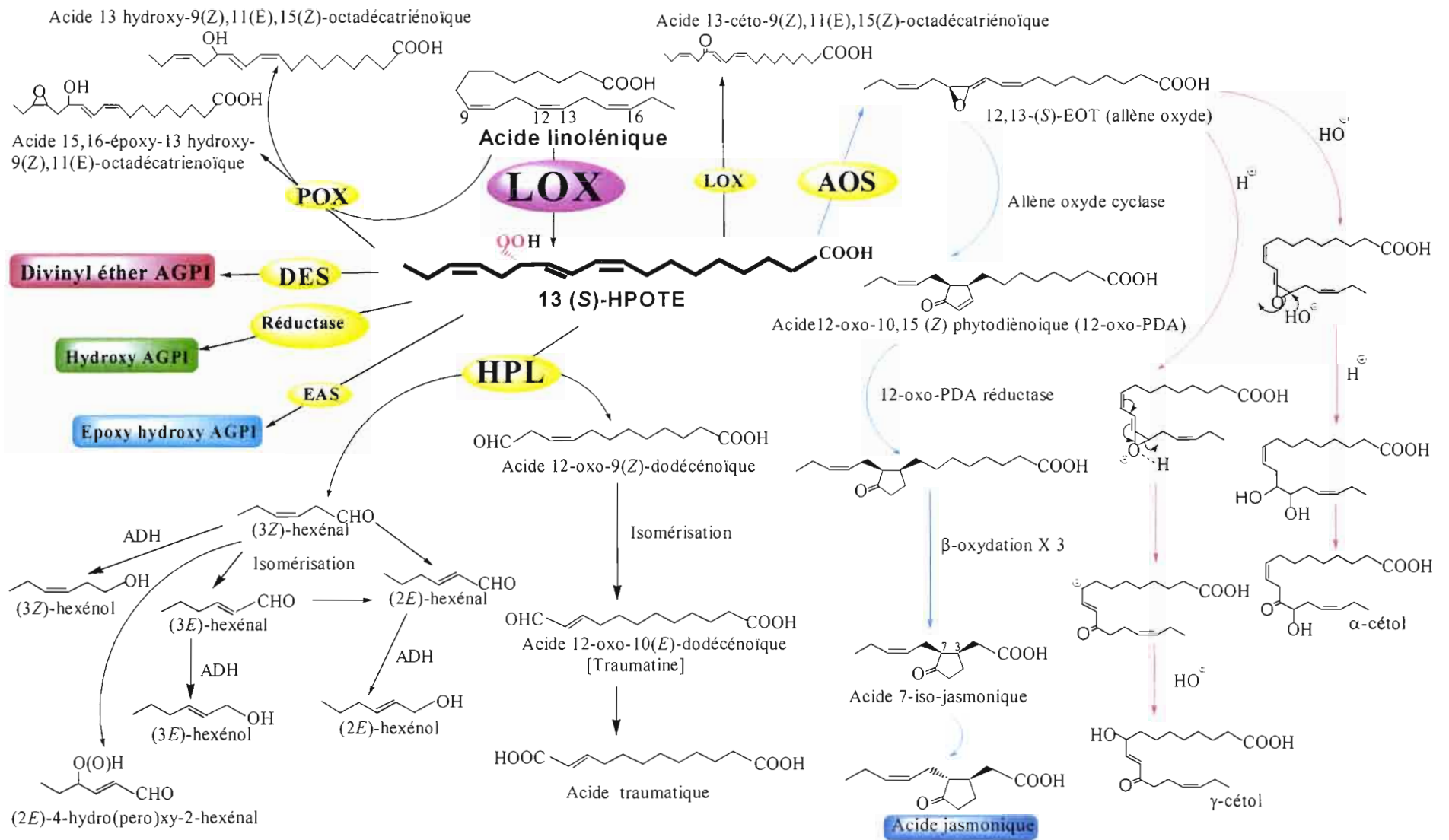


Figure 19: Schéma des principaux métabolites secondaires issus de la décomposition enzymatique des 13-(S)-hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique (C18 : 3) *via* une activité lipoxygénase. Abréviations : ADH, alcool déshydrogénase ; AGPI, acides gras polyinsaturés ; AOS, allène oxyde synthase ; DES, divinyl éther synthase ; EAS, epoxy alcool synthase ; HPL, hydroperoxyde lyase ; LOX, lipoxygénase ; POX, peroxygénase.

Voie de l'hydroperoxyde lyase : voie dans laquelle les hydroperoxydes sont transformés en aldéhyde de courte chaîne (C₆ et C₉) et en ω-oxo- (C₁₂ et C₉) des AGPI (Feussner *et al.*, 2001).

Voie de l'allène oxyde synthase : voie par laquelle l'allène oxyde synthase transforme le 13-(S)-HPOTE en AJ, α- et γ-cétols, les 9-(S)-HPOTE, 13-(S)-HPODE et 9-(S)-HPODE en α- et γ-cétols, mais pas en cyclopentanones (Feussner *et al.*, 2001 ; Grechkin, 1998).

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

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

La notion de peroxydation des lipides est un processus d'oxydation complexe et dangereux pour la cellule. Ce processus est souvent associé à des évènements délétères pour la cellule, comme la perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes. Keppler et Novacky (1986) constatent qu'au cours de l'interaction incompatible entre des cotylédons de pois et de *Ps. syringae*, il existe un parallélisme entre la peroxydation des lipides membranaires, estimée par la production de dialdéhyde malonique (MDA), et la fuite d'électrolytes mesurée par conductimétrie. Plus tard, d'autres travaux démontrent qu'au cours des interactions incompatibles il y a une augmentation de l'activité LOX qui précède l'altération des propriétés des membranes caractérisée par les fuites d'ions (Keppler et Novacky, 1987 ; Ohta *et al.*, 1991 ; Buonauro et Servili, 1999). Ainsi, Li *et al.* (1991) ont montré que les 13-H(P)ODE et 13-H(P)OTE s'accumulent rapidement dans les feuilles de riz infectées par le champignon *Pyricularia oryzae* et sont capables d'éliciter l'accumulation d'une phytoalexine terpénoïdique, le momilactone A. Chez les plantes de cotonnier attaquées par des insectes herbivores, des dérivés volatiles comme le 3-(Z)-hexénal et les acétate-3-(Z)-hexényl ont rapidement été produits (Loughrin *et al.*, 1994).

L'activité spécifique des LOX augmente lors d'interactions incompatibles entre l'avoine et le champignon *P. coronata* ; cette activité est accompagnée de deux isoformes de LOX synthétisées *de novo* (Rosahl, 1996). Ainsi, le traitement des suspensions cellulaires de tabac par une préparation élicitrice d'une souche

avirulente du champignon *P. parasitica nicotianae* ou par l'AJ, se traduit par une augmentation de l'activité spécifique et de l'accumulation des transcrits codant une LOX (Véronési *et al.*, 1996, 1999). Récemment, le rôle de la LOX dans la résistance chez le tabac a été démontré sans ambiguïté (Rancé *et al.*, 1998). En effet, des plantes de tabacs transgéniques exprimant des ADNc de LOX en orientation antisens ont une activité LOX très faible et possèdent une sensibilité importante à une souche avirulente de *P. parasitica nicotianae*. Ces tabacs sont aussi plus sensibles au champignon *Rhizoctonia solani*. Ainsi, d'autres travaux récents ont montré l'augmentation d'une activité spécifique de 9-LOX au cours de la réaction hypersensible induite par des éliciteurs (la cryptogéine) chez les plantes de tabacs (Rustérucci *et al.*, 1999) et sur suspension cellulaire de pomme de terre (Göbel *et al.*, 2001). Rustérucci *et al.* (1999) démontrent que l'accumulation des 9-H(P)OTE et 9-H(P)ODE est nécessaire à l'initiation du processus de mort cellulaire. Chez la pomme de terre, l'acide colnéléique et l'acide colnéléinique sont produits à partir de 9-HPODE et 9-HPOTE par une activité divinyl éther synthase (Grechkin, 1998). Weber et ses collaborateurs (1999) ont montré que l'acide colnéléique et l'acide colnéléinique sont accumulés dans les feuilles des plantes de pomme de terre infectées par le champignon *P. infestans*. Ces auteurs montrent que ces molécules possèdent une activité antifongique en inhibant le développement des hyphes et la germination de spores de *P. infestans*.

Tous ces travaux montrent clairement que le processus d'oxydation des lipides joue un rôle crucial dans les mécanismes de régulation et d'exécution de la mort cellulaire de type hypersensible. Le rôle de ce mécanisme dans la résistance du cotonnier à *Xcm* a été le point central de mes activités de recherche.

C. Les interactions cotonnier – *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*

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

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

1. Les maladies du cotonnier

Le cotonnier peut être attaqué par de nombreux ravageurs et parasites. Le spectre des ravageurs inféodés au cotonnier est très vaste avec plus de 70 espèces d'arthropodes (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 (viroses, maladies à mycoplasmes). Les agents pathogènes les plus fréquemment recensés sont *Colletotrichum gossypium* (Soughe), *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Verticillium dahliae* et *Xcm*.

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

2. *Xcm* : agent de la bactériose du cotonnier

2.1. Taxonomie, morphologie et physiologie

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

La bactérie a la forme d'un bâtonnet de 0.3-0.6 x 1.3-2.7 µm, Gram-négative et possède un seul flagelle polaire. Son métabolisme respiratoire est aérobie strict. Sur 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) associées à un polysaccharide extracellulaire appelé xanthane.

2.2. Le cycle de la bactérie

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

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

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

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

2.3 Variabilité de l'agent pathogène

La variabilité du pouvoir pathogène de la bactérie est importante et a fait l'objet de nombreuses études. En Afrique de l'Est, Arnold et Brown (1968) poursuivant les travaux de Crosse (1963) attribuent la variabilité du pouvoir pathogène de *Xcm* à une variation continue de la virulence ne justifiant pas la création de races définies. Ces résultats contradictoires sont à confronter avec ceux de Gabriel *et al.* (1986) et de De Feyter *et al.* (1992) qui démontrent que l'interaction entre les races de *Xcm* et le cotonnier relève du modèle conventionnel gène pour gène. La mise au point aux Etats-Unis d'une gamme différentielle de cotonnier de l'espèce *G. hirsutum* avec différents gènes majeurs de résistance (Hunter *et al.*, 1968) 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 (Tableau 1). Sur la base de cette étude et des résultats obtenus chez d'autres interactions bactérie-plante où le modèle gène pour gène s'applique, il a été suggéré que le mécanisme principal d'apparition de nouvelles races soit dû à des recombinaisons inter et intragéniques au niveau des gènes *Avr* de la bactérie (De Feyter *et al.*, 1992). L'apparition en Afrique (Burkina Faso, Soudan, Tchad), au début

des années 80, d'une nouvelle race de *Xcm* (la race 20) capable de surmonter toutes les sources de résistances connues pourrait ainsi s'expliquer. Sur un plan pratique, cette approche confirme la validité de la notion de race chez *Xcm* que l'on peut discriminer par des inoculations sur une gamme de variétés différentielles (Hunter *et al.*, 1968).

3. La bactériose du cotonnier

3.1. Historique et répartition de la maladie

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

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

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

Actuellement, la bactériose du cotonnier est recensée dans tous les pays du monde où cette plante est cultivée (CMI distribution Map N°57; Hillocks, 1992)

3.2. Les symptômes aux champs causés par *Xcm*

Le cotonnier peut être contaminé par la bactériose dès le jeune plant, et à tous les stades de son développement. Pour cette maladie, on distingue schématiquement quatre symptomatologies à savoir les taches foliaires anguleuses (angular leaf spot), les nécroses sur tiges non aoûtées (black arm), les lésions sur les capsules (boll rot) et la brûlure des plantules. Ces quatre phases sont induites par le même isolat de *Xcm*. Les symptômes varient selon les organes affectés. Sur les semis et les jeunes plantules, la maladie s'exprime dès le stade cotylédonnaire sous forme de macules huileuses qui provoquent la déformation du limbe. De petites 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 favorisée par des insectes piqueurs qui introduisent la bactérie dans la graine par leur stylet (Brinkerhoff et Hunter, 1963). La présence de *Xcm* dans la semence joue un rôle essentiel dans le développement de la

maladie en assurant la pérennité de l'inoculum primaire d'un cycle cultural à un autre.

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

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

3.4 Les moyens de lutte connus contre la bactériose

En culture cotonnière, peu de maladies sont contrôlées par la lutte chimique. C'est le cas de la bactériose, pour laquelle l'amélioration des techniques culturales (dates de semis, rotation des cultures) et la désinfection de la semence ne suffisent pas à empêcher le déclenchement des épidémies. Les graines contaminées constituent très souvent la source d'inoculum primaire nécessaire à la contamination des organes aériens et au démarrage du processus infectieux. Plusieurs méthodes de traitement des graines ont ainsi été développées en Afrique et aux USA dès les années 1950 pour réduire les taux de contaminations. La méthode la plus communément utilisée est l'arrosage des graines par l'acide de délitage (acide sulfurique, 1% de formaldéhyde et composés mercuriques remplacés graduellement par l'oxyde de cuivre) (Wickens, 1953; Logan, 1960). Cette méthode de lutte très efficace élimine les contaminations de surface, et permet un contrôle efficace et suffisant de la maladie dans des pays comme la Californie, où le climat est trop sec et ne favorise pas l'expression de la bactériose. (Schnathorst *et al.*, 1960). D'autres composés comme l'oxanthiine, la carboxine et l'oxycarboxine (Vina et Granada, 1986), ou encore le bronopol (Dransfield, 1969; Hillocks, 1984) apparaissent pour être efficaces contre l'attaque bactérienne.

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

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

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

Dès le début de l'intensification de la culture cotonnière, la recherche de variétés résistantes a constitué l'une des préoccupations majeures des chercheurs.

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

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

Une variabilité génétique considérable de la résistance à la bactériose existe dans le génome *Gossypium*. Knight et Clouston (1939) démontrèrent les premiers l'héritabilité de la résistance du cotonnier au Soudan. Actuellement, après un screening chez les variétés diploïdes et tétraploïdes, 18 gènes de résistance (nommés gènes-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, pour lequel l'hypothèse de la relation gène pour gène est admise (De Feyter *et al.*, 1992), la résistance du cotonnier aux différentes races de *Xcm* est dépendante des différentes combinaisons des gènes de résistance B et des gènes d'avirulence (*Avr*) de *Xcm*. 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

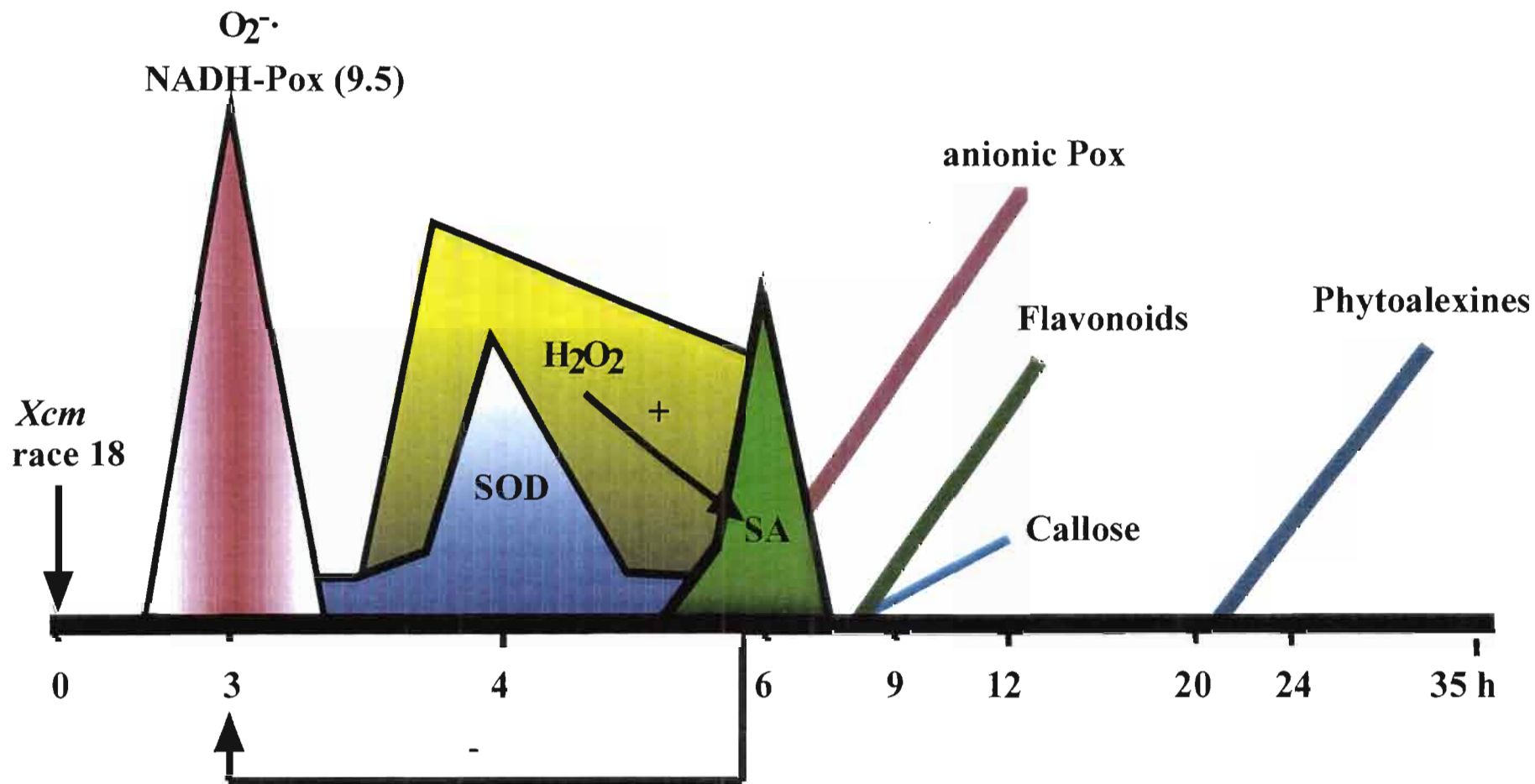


Figure 20 : Résumé des principales réponses produites dans les tissus du cotonnier exprimant la HR.

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

A ce jour, plusieurs réponses adaptatives du métabolisme des cellules infectées de cotylédons de cotonniers résistants ont été identifiées et associées à l'établissement de la RH (voir Figure 20). La plus précoce d'entre-elle est le choc oxydatif qui se distingue par la production d' $O_2^{\cdot -}$ (3h post-infection) générée par une peroxydase cationique apoplastique, identifiée par IEF, cytochimie ultrastructurale (Martinez *et al.*, 1998) et immunocytochimie (Delannoy *et al.*, 2002, non publiés). $O_2^{\cdot -}$ est rapidement dismuté en H_2O_2 (3 à 6h après inoculation) (Martinez *et al.*, 1998) par une SOD dont le pic d'activité se situe 4h post-infection (Jalloul *et al.*, non publiés). Ces auteurs ont également montré que l'accumulation d'AS est induite par H_2O_2 infiltré dans les feuilles (Martinez *et al.*, 2000). En outre, l'infiltration d'AS dans les cotylédons contrôle rétroactivement l'activité de la peroxydase cationique apoplastique. Ces résultats suggèrent un éventuel contrôle du choc oxydatif par l'AS et une induction de la synthèse d'AS par H_2O_2 via l'activation des gènes du métabolisme des composés phénoliques ; ce mécanisme demande cependant à être vérifié *in planta*. L'AS est ensuite produit au voisinage des tissus infectés, puis dans la plante entière, 24 post-infection, révélant un effet SAR, traduit par une réduction des populations bactériennes inoculées tardivement sur des plantes pré-infectées (Martinez *et al.*, 2000). L'AS et H_2O_2 sont deux molécules capables d'induire une augmentation d'activités peroxydases localement et systématiquement (Martinez *et al.*, 2000). Plusieurs gènes de peroxydases ont été clonés au laboratoire (Assigbetsé *et al.*, 1999 ; Delannoy *et al.*, 2002, non publiés) ; leur expression dans les systèmes compatibles et incompatibles, ainsi que les voies de signalisation dont leur activation pourrait dépendre, sont en cours d'étude (Delannoy *et al.*, 2002, non publiés).

Les métabolites secondaires antimicrobiens les plus importants chez le cotonnier sont les terpénoïdes, sous forme d'aldéhydes, uniques dans le genre

Gossypium. Ils peuvent être préformés dans les glandes à pigment, ou être synthétisés *de novo* en réponse à une blessure, ou une infection. Une production de phytoalexines de type terpènes en réponse à *Xcm* a été mise en évidence (Gorski *et al.*, 1995 ; Essenberg *et al.*, 1982, 1990). Deux phytoalexines (2-4-dihydroxycadalène et laciniline) ont été identifiées à partir de feuilles et de cotylédons de plants résistants attaqués par la bactérie, et synthétisées à un niveau suffisant pour inhiber l'agent pathogène au site d'infection (Essenberg et Pierce, 1994). Trois nouveaux sesquiterpènes, les isomères *cis* et *trans* du 7-hydroxycalaménène-2-one, ainsi que le *trans*-7-hydroxycalaménène ont ensuite été isolés dans des extraits de cotylédon de cotonniers résistants durant la période de biosynthèse de phytoalexines sesquiterpénoïdes, après inoculation par *Xcm* (Davila-Huerta *et al.*, 1994). Certaines de ces phytoalexines émettent une fluorescence verte importante dans les cellules en cours de RH ; elles ont été caractérisées sous la forme monomère ou polymère (Essenberg *et al.*, 1992a, b). Au plan moléculaire, le gène de la sesquiterpène cyclase, activé en amont de la synthèse de ces phytoalexines, est transcrit 20h après infection (Davis *et al.*, 1996).

Enfin, une production *de novo* de flavonoïdes a également été mise en évidence autour des sites d'infection pendant la réaction incompatible 9h après inoculation, sans qu'un effet antimicrobien de ces phénols ait été caractérisé (Daï *et al.*, 1996).

D. Objectifs de la thèse

Mes travaux de recherche réalisés au sein de l'équipe « Résistance des Plantes » dans l'UMR « Diversité et Génome des Plantes Cultivées » s'intègrent dans le cadre du rôle des processus oxydants dans la RH. A la lecture de la synthèse bibliographique non exhaustive décrite dans cette introduction, il apparaît que la peroxydation des lipides est un mécanisme clé dans l'établissement de la résistance spécifique. Les quelques évènements identifiés au cours de la RH des cotylédons de cotonnier à *Xcm*, (1) intervention d'enzymes dans des mécanismes d'oxydation (peroxydase, SOD) et (2) production de molécules susceptibles d'être impliquées dans des étapes d'oxydation (H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$), s'inscrivent dans ce contexte.

La question qui m'a alors été posée concernait le(s) rôle(s) de ces molécules dans la stratégie de défense du cotonnier à *Xcm* et plus particulièrement par rapport à la peroxydation des lipides.

Il a donc fallu tout d'abord caractériser le mécanisme d'oxydation des lipides durant la RH. Le **chapitre premier** décrit la démarche expérimentale qui m'a conduite à identifier un tel processus, puis à définir la nature de son mécanisme. J'ai ainsi démontré que la peroxydation des lipides dans les cellules de cotonnier en cours de RH était liée à une activité 9S-LOX, excluant très probablement l'intervention des ROS. Elle est précédée par la transcription du gène *GhkLox 1*, et coïncide avec la perte en eau des tissus et l'apparition des lésions nécrotiques. Les résultats rapportés dans ce chapitre sont présentés sous la forme de deux articles : l'un concerne la peroxydation des lipides *sensus stricto*, alors que l'autre décrit le clonage du gène *GhkLox 1*.

Dans le **second chapitre**, je me suis attachée à approcher les voies de signalisation du mécanisme de peroxydation des lipides dans le modèle cotonnier-*Xcm*. J'ai montré que l'AS et l'AJ exogènes pouvaient activer le gène *GhkLox 1* et stimuler l'activité 9S-LOX *in planta*. Ces indications m'ont incitée à rechercher une éventuelle production d'AJ chez le cotonnier résistant infecté, sachant que l'accumulation d'AS avait déjà été caractérisée auparavant. J'ai ainsi identifié une production très précoce d'AJ au cours de la RH (1,5 à 2 heures après inoculation), antérieure au burst oxydatif (3 à 6 heures), à l'accumulation d'AS (6 heures), à la synthèse de flavonoides (9 heures), aux activités LOX (9 et 24 heures) et à la peroxydation des lipides (24 heures). Ces résultats sont décrits sous la forme d'un article.

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

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

CHAPITRE 1

Lipid peroxidation in cotton – Xanthomonas interactions.

Role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction and leaf blight.

Jalloul, A., Montillet, J.L., Assigbetsé, K., Agnel, J.P., Delannoy, E., Triantaphylidès, C., Daniel, J.F., Marmey, P., Geiger, J.P. et Nicole, M.

Plant Journal, *in press*.

La mort cellulaire programmée est un phénomène actif d'autophagie dû à un changement de l'homéostasie cellulaire qui nécessite généralement la synthèse de protéines via une modification de l'expression de certains gènes. Cette forme de mort cellulaire est distincte de la nécrose et se caractérise par une modification de l'intégrité membranaire et une lyse cellulaire au cours de phénomènes indépendants d'un contrôle génétique (Kosslak *et al.*, 1997). Dans tous les organismes multicellulaires, la mort cellulaire programmée est observée lors de certaines phases de développement, en réponse à des stimuli endogènes (calcium) ou exogènes (agents pathogène ou toxines). Chez les animaux, l'apoptose est la forme de mort cellulaire programmée la plus rencontrée qui se caractérise par un certain nombre de modifications morphologiques et moléculaires telles que la condensation et la fragmentation de la chromatine, la condensation du cytoplasme, du noyau et des organelles, et la formation des corps apoptotiques subcellulaires (Greenberg, 1996 et 1997 ; Heath, 1998 ; Drew *et al.*, 2000).

Chez les végétaux, la mort cellulaire programmée est entre-autre associée à la réaction hypersensible et au déclenchement des réponses de défense lors des interactions plante/parasite (Greenberg, 1997). De nombreuses données bibliographiques indiquent qu'elle se développe en réponse à l'application des ROS et que la peroxydation des lipides pourrait directement jouer un rôle crucial dans son induction (Adam *et al.*, 1989; Mittler *et al.*, 1996 ; Porter *et al.*, 1995; Rustérucci *et al.*, 1996). Dans les cellules végétales, on trouve une proportion non négligeable de phospholipides (membranes cytoplasmiques), galactolipides (membranes chloroplastiques) et triglycérides (lipides de réserve). Presque toutes les chaînes d'acides gras de membranes cellulaires ont un nombre pair d'atomes de carbone (16, 18 ou 20). Les chaînes acyles insaturées les plus courantes ont une liaison double, mais certaines ont deux trois ou quatre. Du fait de leur structure, les chaînes acyles insaturées sont très sensibles à l'oxydation. Ce processus d'oxydation, appelé peroxydation des lipides est un processus d'oxydation complexe et dangereux pour la cellule, peut être initié par certaines ROS ou catalysé par des lipoxigénases (Brash, 1999), entraînant des perturbations de la micro-architecture membranaire et altère les fonctions des enzymes et transporteurs membranaires (Porter *et al.*, 1995). Récemment, le rôle de la LOX dans la résistance chez le tabac a été démontré sans ambiguïté (Rancé *et al.*, 1998). En effet, des plantes de tabacs transgéniques exprimant des ADNc de LOX en orientation antisens ont une activité LOX très faible et possèdent une sensibilité importante à une souche avirulente de *P. parasitica*

nicotianae. Ainsi, d'autres travaux récents ont montré l'augmentation d'une activité spécifique de 9-LOX au cours de la réaction hypersensible induite par des éliciteurs (la cryptogéine) chez les plantes de tabacs (Rustérucchi *et al.*, 1999) et sur suspension cellulaire de pomme de terre (Göbel *et al.*, 2001). Rustérucchi *et al.* (1999) démontrent que l'accumulation des 9-H(P)OTE et 9-H(P)ODE est nécessaire à l'initiation du processus de mort cellulaire.

Chez le cotonnier, la résistance à *Xcm* est spécifiée par la présence de gènes de résistance B_2B_3 , dont les produits interagissent spécifiquement avec ceux des gènes d'*avr* de la race 18 de *Xcm* pour conduire à une mort cellulaire de type hypersensible. Plusieurs caractéristiques ultra-structurales, se rapprochant de celles décrites pour l'apoptose, ont observées telles que des modifications des systèmes membranaires associées à la condensation du cytoplasme et la chromatine et à la rétraction du plasmalemmes et sa vésiculation. Parmi les événements associés à la RH du cotonnier, la production de ROS 3 à 6 heures après inoculation est suffisamment précoce pour nous permettre d'envisager son intervention dans les processus de peroxydation des lipides membranaires reliés à la mort hypersensible.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire au cours de l'interaction cotonnier /Xcm, nous avons étudié la peroxydation des lipides membranaires. Les analyses biochimiques et moléculaires ont montré le rôle essentiel d'une 9S-LOX dans la peroxydation des lipides. L'expression du gène GhkLox1 est associée à l'augmentation d'activité de la protéine, l'apparition des lésions et la perte en eau des cellules infectées. Durant la maladie causée par une race compatible (race 20), la peroxydation des lipides membranaires résulte aussi d'une activité 9S-LOX plus faible et tardive (3 jours après infection), accompagnant la chlorose des tissus mais pas la nécrose.

Abstract

Lipid peroxidation that occurs during plant cell death may be initiated by free radicals or lipoxygenases (LOX). Here we report the involvement of 9S specific -LOX in both incompatible and compatible interactions between Reba B50 cotton cultivar and *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* (*Xcm*). In response to race 18 of the bacterial pathogen, the hypersensitive response is characterized by a massive production of 9S-fatty acid hydroperoxides. The process was accompanied by the increase of 9S-LOX activities 9 and 24 hours post-infection, preceded by transcription of a LOX gene (*GhKLox 1*), and associated with water loss and HR cell death of infected tissues. During disease developed by this cotton cultivar in response to race 20 of *Xcm*, a 9S LOX-dependent lipid peroxidation is also observed. However, the oxidation process was less intense (about one third) and took place later (beyond 2 days post-infection) than the one detected during HR. In addition, in contrast to the incompatible interaction, lipid peroxidation seemed to be correlated to tissue chlorosis, but not necrosis.

Keywords: hypersensitive response, lipoxygenase, lipid peroxidation, cotton, *Xanthomonas*.

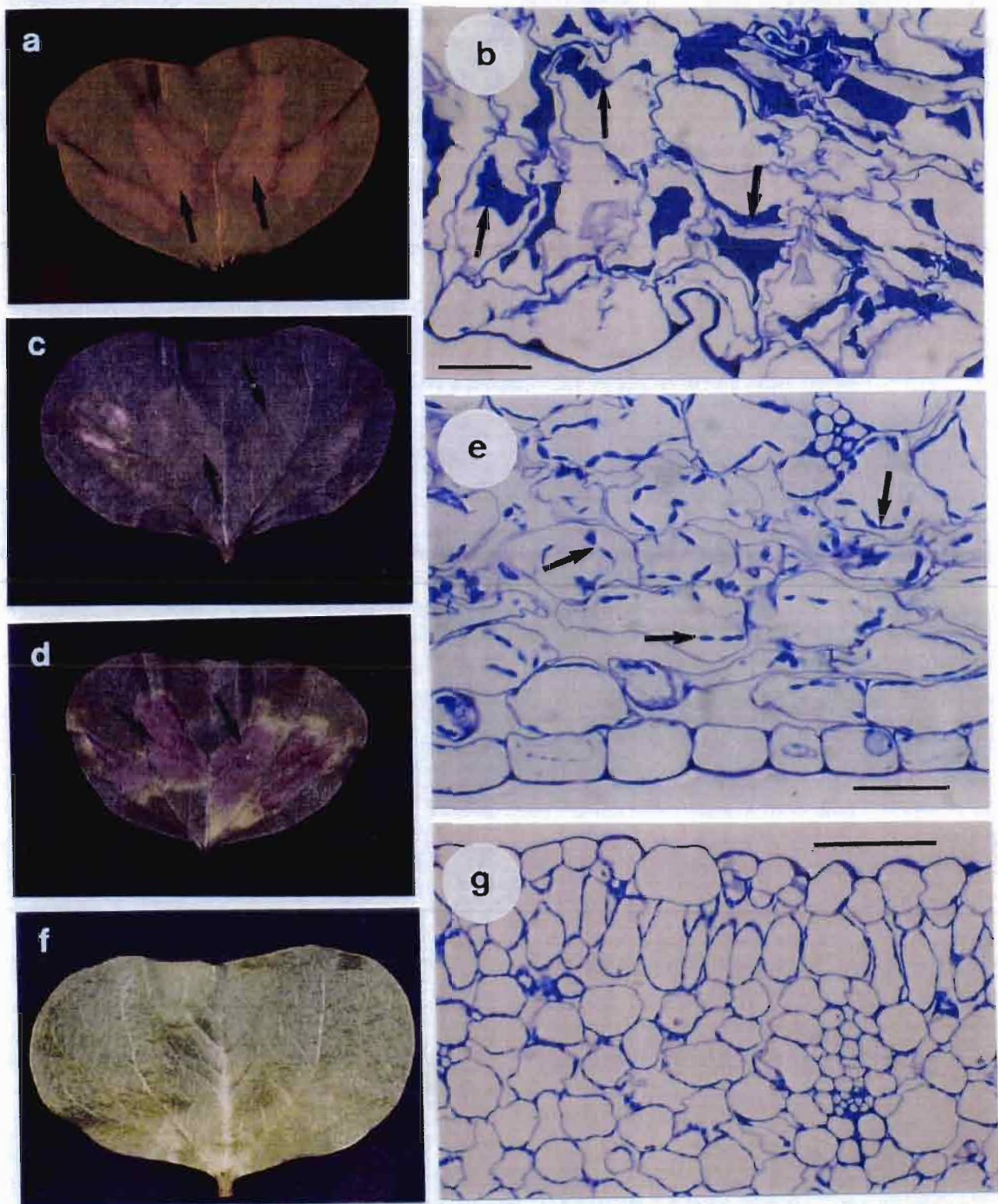
Varietal resistance to pathogenic microbes based upon gene-for-gene interactions typically results in the hypersensitive reaction (HR), the phenotype of which is characterized by dry necrotic lesions associated with restriction of pathogen growth. Hypersensitive cell death appears to be genetically controlled, indicating that HR may be an example of programmed cell death in plants (Heath, 1998; Pontier *et al.*, 1998). Dramatic damages undergone by membranes during HR were correlated with PUFA hydroperoxide production (van Ginkel and Sevanian, 1997) and associated with active oxygen species (AOS) generation (Adam *et al.*, 1989; Mittler *et al.*, 1996; Porter *et al.*, 1995; Rustérucchi *et al.*, 1996). Because AOS are able to initiate PUFA peroxidation in membranes they were suspected to trigger the oxidative degradation of the latter via a propagation process linked to the production of fatty acid free radicals by autoxidation (Porter *et al.*, 1995). Generation of AOS during the oxidative burst is a key early event during incompatible plant-pathogen interaction (Bolwell, 1999) that occurs upstream of important other mechanisms, including activation of defense genes, accumulation of salicylic acid (SA) and lipid peroxidation. It was generally admitted that oxidative degradation of membranes by AOS may be a causative factor exacerbating hypersensitive cell death. Accordingly, the use of scavengers or inhibitors, or inhibition of AOS generating systems suppresses or delays both lipid peroxidation and hypersensitive cell death (Doke and Ohashi, 1988).

Peroxidation of membrane lipids may also result from lipoxygenase activity (LOX, EC 1.13.11.12) (Brash, 1999). The generated PUFA hydroperoxides are known to interact with transition metals to produce radicals which are highly corrosive for membranes (Grechkin, 1998). Induction of damages in membrane structure by LOXs during HR was suggested as an alternative hypothesis to the AOS role for fatty acid radical production, and the process might be propagated by autoxidation (Croft *et al.*, 1990). Activation of LOX was demonstrated in several plants both during compatible (Alami *et al.*, 1999) and incompatible interactions (Buonaurio and Servili, 1999; Bolhand *et al.*, 1997; Göbel *et al.*, 2001; Kolomiets *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 1994; Slusarenko, 1996; Slusarenko *et al.*, 1993; Véronési *et al.*, 1996). Suppression of incompatible interaction in transgenic tobacco plants expressing antisense LOX reinforced the fact that LOX plays a key role in plant resistance to pathogens (Rancé *et al.*, 1998). Nevertheless, the possible participation of these enzymes in the synthesis of some critical oxilipin signals and / or their involvement in hypersensitive cell death execution through oxidation of membrane lipids is still unclear.

The idea that induction of a LOX pathway could be considered as an active process of membrane degradation leading to hypersensitive cell death led Rustérucchi *et al.*, (1999) to investigate whether lipid peroxidation during HR is induced by AOS and free radicals, or was the result of a LOX action. These authors demonstrated that a 9-LOX-dependent lipid peroxidation pathway was activated during HR displayed by tobacco leaves following treatment by the fungal elicitor cryptogein. They showed that this 9-LOX used free fatty acids as substrates and provided evidence that polyunsaturated fatty acids hydroperoxides were responsible for tissue necrotic lesions. Despite this recent evidence that activation of the LOX pathway in a plant/elicitor system appears as being an active mechanism in plant-hypersensitive cell death (Göbel *et al.*, 2001; Rustérucchi *et al.*, 1999), the question of whether membrane lipid peroxidation contributes to cell death or is the consequence of cell death in plants showing pathogen-induced HR has is still an open question.

In the present study we investigated the time course of LOX activity induced in cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) responding hypersensitively to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* (*Xcm*) (De Feyter *et al.*, 1993). In the incompatible interaction between the cultivar Reba B50, carrying the B₂B₃ blight resistance genes which confer immunity to the avirulent race 18 of *Xcm* (Innes, 1983), a sharp production of superoxide anions (O₂⁻) was characterized at HR sites, 3h after cotyledon infection, followed by an accumulation of H₂O₂ between 4 and 6h post-inoculation (Martinez *et al.*, 1998). Hydrogen peroxide was shown to be required for accumulation of salicylic acid (SA) locally, 6h post-infection at HR sites, and systemically, 24h post-inoculation in the whole plant (Martinez *et al.*, 2000). Increase in peroxidase activity, accumulation of flavonoids (Dai *et al.*, 1996), and synthesis of sesquiterpene phytoalexins were also associated with expression of resistance (Essenberg *et al.*, 1992). To gain better insights into mechanisms involved in irreversible membrane disorganization of cotton cells as microscopically observed (Dai *et al.*, 1996), lipid peroxydation was investigated in cotyledon tissues undergoing HR. The pattern in fatty acid hydroperoxide isomers and enantiomeric composition of each of them were assessed in order to discriminate between a free radical-mediated process, or a LOX pathway, i.e. nonspecific *versus* specific peroxidation, respectively. Lipid peroxidation was analyzed in the present work using a previously established hydroxy fatty acid HPLC assay (Degousée *et al.*, 1994) and was further investigated by chiral phase HPLC (Feussner *et al.*, 1997; Rustérucchi *et al.*, 1999). Our results demonstrated that in the incompatible interaction a 9S-LOX

Figure 1



activity was responsible for lipid peroxidation, associated with water loss of inoculated tissues, and correlated with HR cell death. During disease, lipid peroxidation in cotton inoculated with the virulent *Xcm* race 20 resulted from a late and weak 9S-LOX activity, associated with tissue chlorosis and preceding water loss and complete necrosis of infected tissues.

Results

Symptoms of cell death during cotton HR and disease; correlation with water loss

Cell death in plants is a complex, highly regulated process that involves dismantling of chloroplasts, degradation of macromolecules such as proteins, nucleic acids and lipids. During HR and disease, cell death appears to play opposite roles, since phenotypically associated with resistance or susceptibility, respectively.

In the incompatible interaction cotton Reba B50 - avirulent *Xcm* race 18, 24h post-inoculation HR symptoms were visible as dry lesions (Fig. 1a)¹ in which, cells exhibited condensed cytoplasm intensely stained with toluidine blue (Fig. 1b). The HR symptoms were correlated with tissue dehydration which increased about 2 fold from 12h to 48h (Fig. 2). During disease, cotyledons of the cultivar Reba B50 interacting with the virulent *Xcm* race 20 displayed chlorosis 72h post-inoculation (Fig.1c). Cells of infected tissues showed a withdraw of the cytoplasm from the wall, associated with rupture of plasma membranes (Fig. 1e). Necrosis of the infected susceptible tissues was completed 168 h post-infection (Fig. 1d).

Water loss started 4 days and significantly increased 5 days (120 h) following infection (Fig. 2). In contrast, cells of water-infiltrated cotyledons did not display any apparent modifications (Fig. 1f, g). These observations together with previous ultrastructural examination of infected cells (Daï *et al.*, 1996) suggested occurrence of severe membrane damage during both interactions raising the question of involvement of lipid peroxidation in membrane alteration during HR and /or disease.

¹ **Figure 1.** Macroscopic and light microscopic aspects of HR lesions and disease symptoms.

(a, b) In the incompatible interaction, HR on *Xcm* race 18-infected cotyledons (a ; arrows) 24 hours pi with parenchyma cells showing a dark blue coagulated cytoplasm (b : arrows ; scale bar = 10µm). (c) In the compatible interaction, 72 hours pi, slight tissue chlorosis is observed on *Xcm* race 20-infected cotyledons (arrows), while (d) necrosis surrounded by chlorotic areas (arrows) characterized disease symptoms 5 to 7 days after infection. (e) Infected compatible tissues display cells with retracted cytoplasm from the cell wall (arrows) without any coagulated cytoplasm (scale bar = 10µm). (f, g) Water-infiltrated cotyledons do not show any apparent modifications of tissues (g ; scale bar = 10µm).

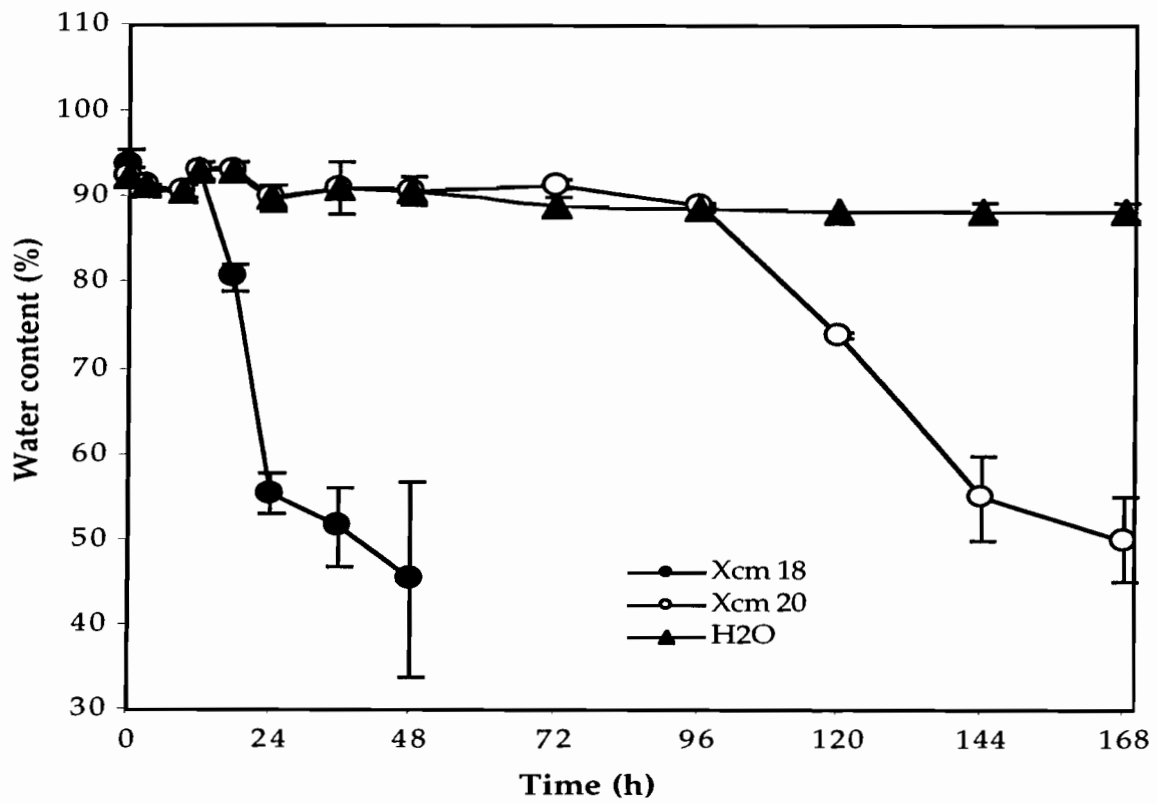
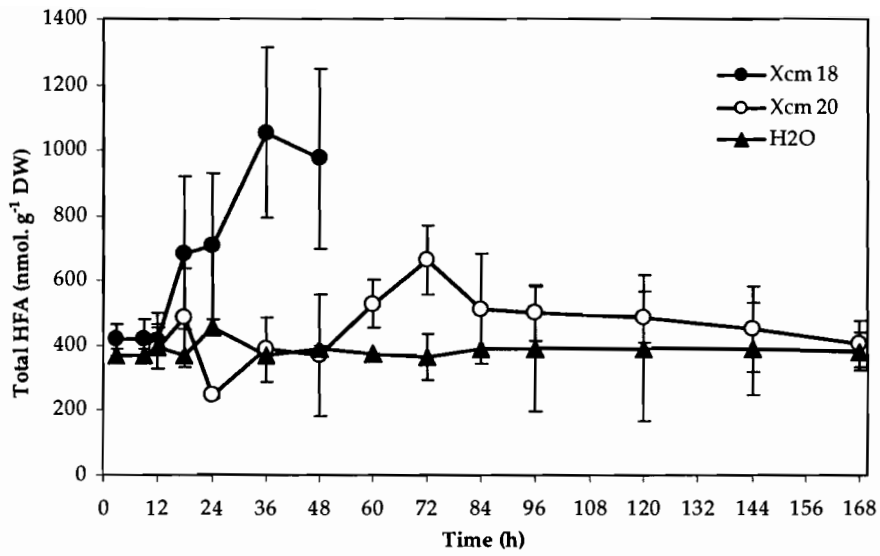
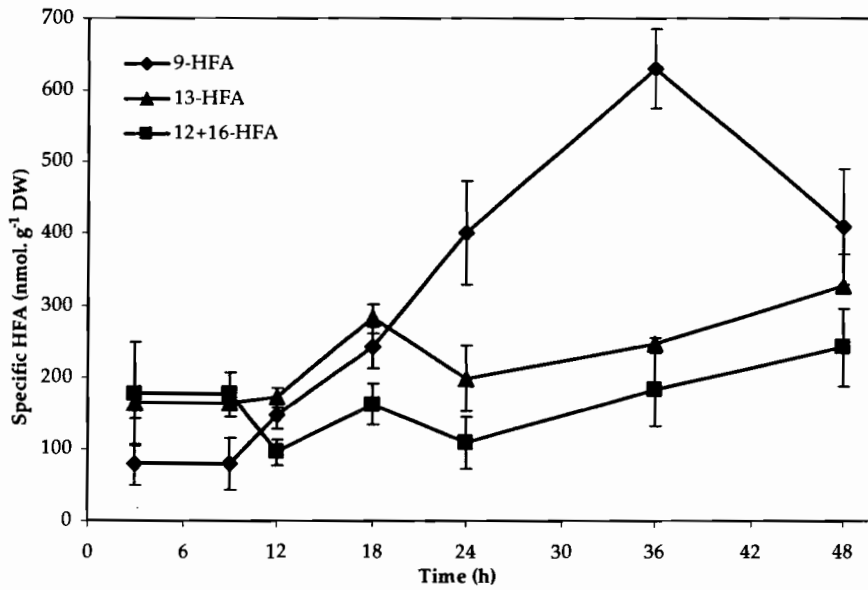
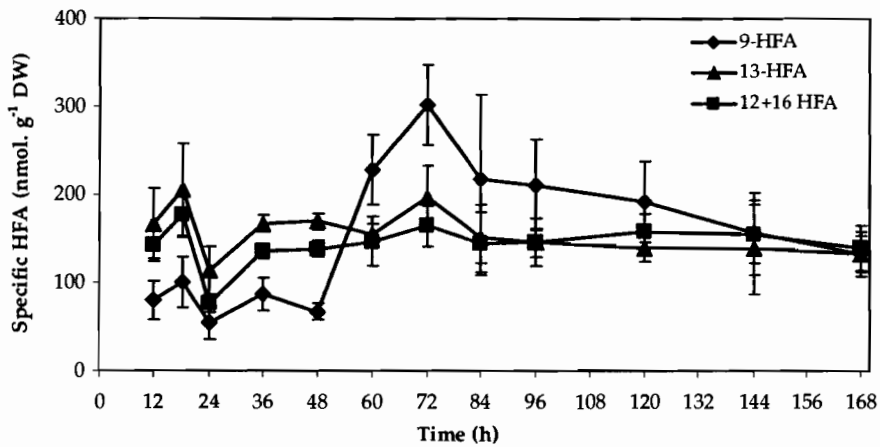


Figure 2. Water loss in cotyledons infected with Xcm race 18 (●) or Xcm race 20 (○), and in water-infiltrated tissues (▲). Mean and SD from three independent experiments are given.

a**b****c**

LOX-mediated lipid peroxidation in cotton interacting with Xcm

Time course change in lipid peroxidation was investigated in cotton cotyledons inoculated with either the avirulent race 18 or the virulent race 20 of *Xcm*. Cotyledons infiltrated with water were used as controls. For each time point, hydroperoxy fatty acids were determined using straight phase HPLC analysis of hydroxy fatty acids (HFA) obtained after NaBH₄ reductive extraction and saponification of total lipids (Degoussé et al, 1994). The sum of the different HFA positional isomers from octadecadienoic (HODE) and octadecatrienoic (HOTE) acids was determined and represented the total lipid peroxidation of the tissue (Fig 3a)².

Whereas in inoculated and in water-infiltrated tissues no change in lipid peroxidation was observed by 12 h, the latter started to rise at 18 h only in cotyledons interacting with the avirulent race of *Xcm* reaching a maximum value of about 1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW of HFA between 36 to 48 h. During the first 2 days, HFA levels remained low (400 nmols g^{-1} DW) and unchanged in both water-infiltrated or in *Xcm* race 20-inoculated tissues. In control tissues, for at least 7 days, this basal lipid peroxide level was maintained, whereas it increased significantly from day 2 pi and culminated at a value of 650 nmols g^{-1} DW 24 h later for *Xcm* race 20-inoculated tissues. The peroxide concentrations then slowly decreased to get back the basal level at around day 7.

The figures 3b and 3c clearly showed that lipid peroxidation observed during both incompatible and compatible interactions predominantly resulted in production of the 9 isomers of HFA. Whereas, during the incompatible interaction (Fig 3b), the proportion of these specific isomers was around 20 % until 12 h, it sharply increased to about 60 %, during the next 24 h. At 48 h, although the 9 isomers were still the most abundant peroxides their proportion decreased to about 40 %. This was due to

² Figure 3. Time course of lipid peroxidation in *Xcm*-treated cotyledons.

Hydroxy fatty acids were extracted from control, *Xcm*-20 and *Xcm*-18-treated cotyledons at different times following infiltration, using the NaBH₄ reduction-hydrolysis procedure and analyzed by HPLC.

(a), Level of total HFA in *Xcm*-18 (●) and *Xcm*-20 (○) inoculated cotyledons, and water-infiltrated tissues (▲). (b, c) Level of specific HFA in *Xcm*-18 and *Xcm* -20 treated cotyledons, respectively; the level of 9-HFA (●) and 13-HFA (▲) represented the sum of the respective isomers from HODE and HOTE, while 12- AND 16 HFA (■) were the sum of 12-HOTE + 16-HOTE. Mean and SD from three independent experiments, with 3 samples for each time, are given.

a decrease in the concentration of the 9 isomers and to a slight increase in the levels of the 13 and 12+16 counterparts. Similarly, during the interaction with the virulent race 20 of *Xcm*, (Fig 3c), the 9 isomers of HFA which represented about 20 % of the total HFA until 48 h pi became the major peroxides (about 50 % of the total HFA) present during the peroxidation process (between 2.5 days and 3 days).

As far as these results strongly suggested that the peroxidation process involved the activity of a LOX specific for the carbon 9 of the octadecapolyenoic acids, we determined the enantiomeric ratios of the 13 and 9 isomers of HFA, (Table I).

Table 1. Enantiomer composition of the hydroxy fatty acids obtained by the NaBH₄ reduction and lipid hydrolysis procedure from control and *Xcm* (18 or 20) inoculated Reba-B50 cotyledons

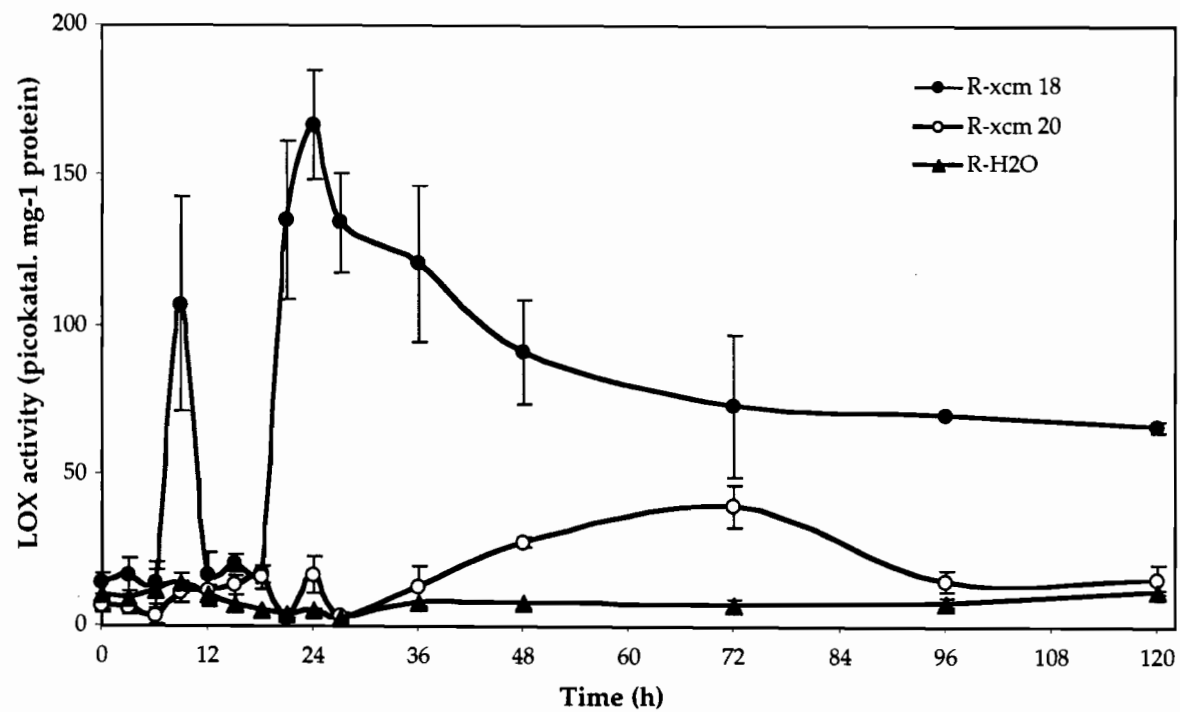
Interaction (race, time post-infection)	Enantiomeric ratio (S/R ± SD) of HFA			
	9-HODE	9-HOTE	13-HODE	13-HOTE
Incompatible (race 18, 24 h)	82/18 ± 3.3	81/19 ± 0.9	56/44 ± 3.4	64/36 ± 4.4
Incompatible (race 18, 48 h)	77/23 ± 1.4	81/19 ± 0.9	51/49 ± 0.2	63/37 ± 0.6
Compatible (race 20, 24 h)	54/46 ± 0.6	48/52 ± 2.3	51/49 ± 0.4	48/52 ± 0.5
Compatible (race 20, 72 h)	ND	63/37 ± 1	ND	ND
Water-treatment (Control, 48 h)	55/45 ± 3.4	47/53 ± 2	51/49 ± 0.9	55/45 ± 1.7

Results are expressed as mean ± SD of 3 independent experiments.

ND : not determined

As expected, in absence of any detectable lipid peroxidation, 48 h after the water infiltration or 24 h following inoculation with the virulent race 20 of *Xcm* all the HFA stereo-isomers were racemic. In contrast, during the incompatible interaction, 24 and 48 h pi, 9-HODE, 9-HOTE and 13-HOTE were chiral with a marked predominance of the *S* enantiomer (80 % for the 9-isomers and about 60 % for 13-HOTE). As we also observed a 9-specific lipid peroxidation around 3 days pi of Reba B50 cotyledons with the virulent race of *Xcm*, we determined the enantiomeric ratio of the most abundant HFA, 9-HOTE, present in the lipid extracts. The results in Table I showed that *S* enantiomer represented more than 60 % of the mixture indicating that this metabolite was chiral. Globally, LOX-dependent peroxidation appeared to be greater

FIGURE 4a



than autoxidation which was observed through the increased levels of 12- and 16-HOTE (Fig. 3b). These data showed that lipid peroxidation in hypersensitive cotton cells resulted from, (1) an intense 9S-LOX activity and (2) a weak autoxidation process.

Characterization of LOX activity in Xcm – cotton interactions.

According to the above results clearly showing that HFA which accumulated during the peroxidative processes were of 9 S type, we tried to characterize the LOX activity potentially responsible of such a production.

LOX activity was first followed over time for the two interactions and the control³. As shown in figure 4a, whereas no change in the basal activity is observed in extracts from water-control plants over a period of 5 days, the incompatible interaction is characterized by a spike of LOX activity centered at 9 h pi and followed by an intense and long-lived peak with a maximum at 24 h (at day 5 the LOX activity was still 40 % of the maximum). During the compatible interaction, a wave of weak activity showing a maximum at 3 days pi was observed.

In order to further establish that there was a causal link between lipid peroxidation process and the LOX activity, regiospecificity and the enantioselectivity of this activity was determined (Table 2).

It appeared that even in the extracts from control plants, the basal LOX activity was specific of the 9 position when linoleic acid was used as substrate. However, the 9-specificity was clearer (between 80 to 96 %) in extracts containing high levels of activity (i.e. during the incompatible interaction at 9, 24 and 72 h or during the compatible one at 72 h). In addition, the enantioselectivity was high in each LOX extract as shown by the chiral analysis of the products (between 82 to 94 % for 9-HODE and close to 100 % for 13-HODE).

The specificity of the LOX activities that were characterized during both interactions was in accordance with the productions of 9 S-HFA that we described above. However, after inoculation with *Xcm* race 18, the spike of 9 S LOX activity at 9 h did not correlate both with HFA production (Fig. 3a), water loss and HR symptoms (Fig. 1a, 1b and 2) detectable around 18-24 h.

³ **Figure 4a.** Time course of LOX activity in water-, *Xcm*-20 and *Xcm*-18 infiltrated Reba-B50 cotyledons. LOX activity was measured using 18 :2 as substrate according to the UV method reported in Material and Methods section ; (● : *Xcm*-18, ○ : *Xcm*-20, ▲ : control). Protein concentration of samples was measured by the Bradford method, and each point represented the Mean and SD of the specific activity from 5 replicates.

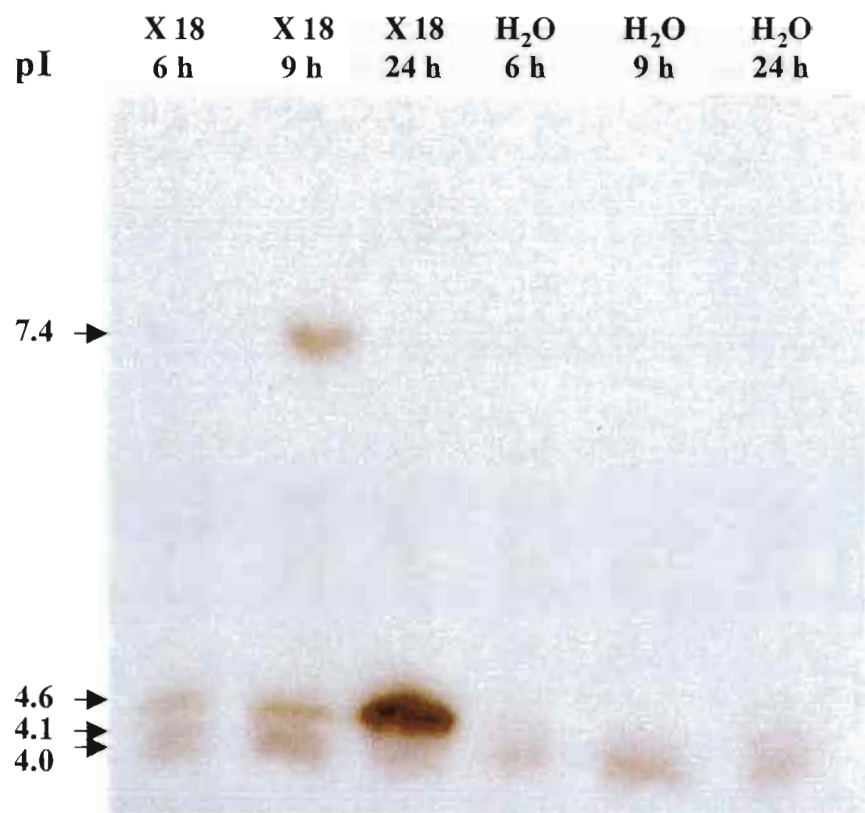


FIGURE 4b

Table 2. Regiospecificity and enantioselectivity of LOX extracts obtained from *Xcm* (race 18 or race 20) or water-infiltrated cotyledons.

Interaction (race, time post infection)	Regiospecificity (9-HODE/13-HODE) ratio	Enantioselectivity : S % \pm SD	
		9-HODE	13-HODE
Incompatible (race 18, 9 h)	79/21 \pm 1	82 \pm 0.5	100 \pm 0.1
Incompatible (race 18, 24 h)	94/6 \pm 2	94 \pm 0.1	100 \pm 6.0
Incompatible (race 18, 72 h)	96/4 \pm 1	92 \pm 1.0	100 \pm 0.5
Compatible (race 20, 72 h)	91/9 \pm 1	84 \pm 1.0	100 \pm 0.5
Water-treatment (Control, 9 h)	58/42 \pm 1	80 \pm 0,5	100 \pm 0.5
Water-treatment (Control, 24 h)	73/27 \pm 1	90 \pm 0.1	100 \pm 0.1
Water-treatment (Control, 72 h)	72/28 \pm 1	90 \pm 3.0	100 \pm 0.5

Enzymatic specificities of LOX were determined in vitro using linoleic acid (18:2) as substrate.

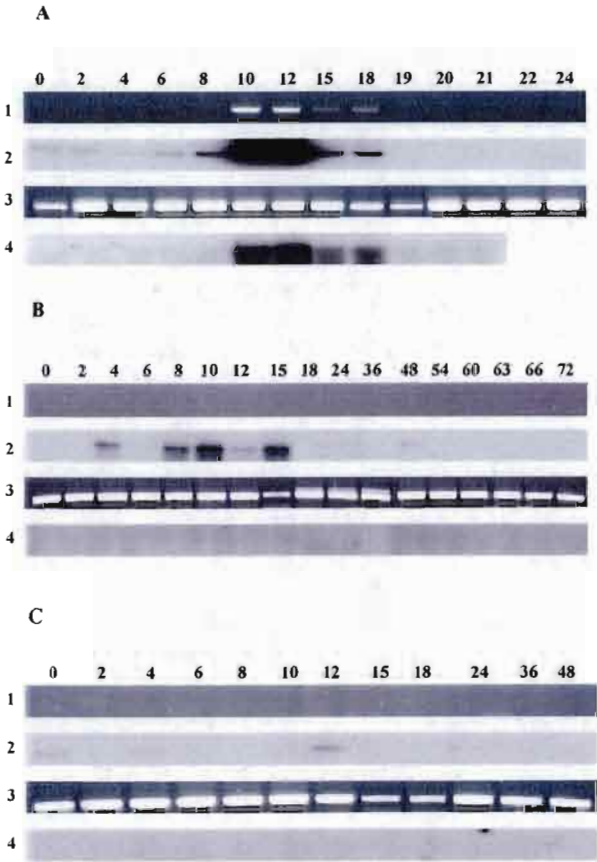
At the end of incubation with cotyledon extracts, hydroperoxydes were reduced with NHBH₄ according to the procedure discribed. The 9HODE/13HODE ratio was measured after HPLC separation of the products on a straight phase column. 9 and 13 hydroxy acids were collected individually and for each of them, the abundance in the S enantiomer was evaluated after separation of the both enantiomers (R and S) on a chiralcel column.

Results are expressed as mean \pm SD of 3 independent experiments.

This might suggest difference in LOX isoforms present in cotton tissues between 9 and 24h pi. This was assessed after separation of soluble proteins of cotton by vertical IEF and visualization of LOX activities on gels using linoleic acid as substrate and ortho-dianisidine as staining compound (Fig 4b)⁴. The data revealed at least four LOXs isoforms with different apparent isoelectric points; one neutral form (pI 7.4)

⁴ **Figure 4b.** Separation of LOX isoforms by vertical IEF. Gels (pH 3 -10) were stained for LOX activity using 18:2 as substrate and ortho-dianisidine as staining, in phosphate buffer (pH 7) (25 μ g of total protein per lane). lanes a, b, c : incompatible interaction 6, 9, 24 hours post-infection ; lane d to f : water-infiltrated cotyledons 6, 9, 24 hours post-treatment.

Figure 5



present only at 9 h after inoculation with *Xcm* race 18, and three overlapping acidic ones (pI 4 to 4.6) the activity of which was constitutively present in extracts of control cotyledons, enhanced at 9 h and particularly at 24 h, in extracts of inoculated plants.

Expression of Ghklox 1 gene during Xcm-cotton interactions

Time course of expression of a cotton LOX gene cloned from cotyledon tissues - *Ghklox 1* was studied in RNA extracts from water-, *Xcm* 18- or 20-infiltrated cotyledons harvested at various times. Expressions were analyzed at several levels by (1) semi-quantitative RT-PCR using specific primers, (2) hybridization of the PCR products with the LOX gene as probe, (3) Northern-blot on cotyledon total RNAs using the LOX gene as probe.

During the incompatible interaction (Fig. 5a)⁵, we observed, by the three approaches, expression of *GhkLox 1* with accumulation between 6 and 18h pi, and a maximum at 12h. Sizes of expected bands were 1,060 Kb (between 1189 and 2249) for the RT-PCR, and 2,835 Kb for the Northern-blot. No signals were detected on RT-PCR and northern blots for the compatible interaction (Fig. 5b, lanes 1 and 4) and the control plants (Fig. 5c, lanes 1 and 4). However using sequential hybridization of the PCR products with the LOX gene as probe, the results showed a weak expression of *GhkLox 1* between 4 and 15h pi in *Xcm*-20 cotyledons (Fig. 5b, lane 2). In water-infiltrated cotyledons, no significant expression was detected (Fig 5c, lane 2).

⁵ **Figure 5.** Analysis of *GhkLox1* gene expression in water-, *Xcm*-20 and *Xcm*-18 infiltrated Reba-B50 cotyledons.

(a) LOX expression during the incompatible interaction (*Xcm* race 18); cotyledons were harvested at various times (0 to 24 hours) following inoculation. *Lane 1* : cDNAs was generated from various time during interaction of *Xcm* 18- Reba B 50, subjected to PCR using primers that recongize *Ghklox1*, spanning base-pairs 1102-2162. RT-PCR was performed with *GhKLox 1* specific primers on RNA from *Xcm*-infected tissues. *Lane 2* : gel with the amplification products obtained with the *GhKLox 1* primers were transferred to a nylon membrane and successively hybridized with the *GhKLox 1* cDNA probe. *Lane 3* : amplification was also realized using a pair of cotton actin-specific primers as an internal control. *Lane 4* : Northern-blot analysis of LOX transcripts accumulated in infected cotyledons (20 µg of total RNA per lane).

(b, c) LOX expression during the compatible interaction (*Xcm* race 20) (b) and in water infiltrated cotyledons (c). Cotyledons were harvested at various times (0 to 72 hours) following race 20 inoculation or 0 to 48 hours after water infiltration. No significant signal could be detected neither with RT-PCR (lane 1) nor following Northern-blot analysis (lane 4). *Lane 2* : gel with the amplification products obtained with the *GhKLox 1* primers were transferred and hybridized with the *GhKLox 1* cDNA probe, a weak signal was detected between 4 and 15 hours after inoculation of *Xcm* 20, and not significant signals were detected in the control. Cotton actin was amplified as an internal control (lane 3).

Discussion

Activation of cell death in bacterial-induced HR has often been mentioned to be associated with lipid peroxidation initiated either by free radicals or LOX activity (Buonaurio and Serili, 1999). In the present work, we report that in cotyledon cells of the Reba B50 cotton cultivar containing the B_2B_3 resistance genes, hypersensitive death induced by the avirulent race 18 from *Xcm* is correlated with a massive LOX-mediated production of 9 S-HFA and tissue dehydration.

In addition, during the critical phase of the peroxidation process (between 24 and 48 h) the levels of 13-HFA increased slowly (Fig. 3b), but remained low, indicating that a minor proportion of PUFA was peroxidized on the 13 position. The synthesis of 13-HFA was clearly LOX-dependent for linolenic acid since 13-HOTE was chiral 24 and 48 h pi (Table 1). Racemicity of the 13-HODE might however be explained by the fact that it never exceeded few percents of total HFA. In these conditions, the enzymatic signature can be masked by autoxidation of the corresponding fatty acid. Nevertheless, regiospecificity and enantioselectivity of LOX activity characterized in cotyledon extracts at 24 h pi (Table 2) was in accordance with its involvement in the production of the 13 and 9-HFA. In parallel, the low levels of 12 and 16-HFA, slightly but significantly, increased confirming the progress of a minor autoxidation phenomenon (Fig. 3b).

Upstream from this LOX-mediated lipid peroxidation, a narrow peak of intense LOX activity was observed at 9 h (Fig 4a). Enzymatic specificity determined on the corresponding extracts was slightly different from that determined at 24 and 72 h pi (Table 2), but it appears that it did not lead to any lipid peroxidation (Fig 4a). In addition, it took place about 9 h before the appearance of significant water loss and HR symptoms (Fig. 1 and 2). Analysis of the corresponding extracts by electrophoresis on IEF gels revealed the presence of a specific neutral LOX isoform (Fig. 4b). The activity of the acidic isoforms (particularly the pI 4.6 one) seemed however, to be specific of HR, although slightly induced at 9 h also. The increase in pI 4.6 LOX isoform activity and the appearance of a pI 7.4 band paralleled the increase in 9S-LOX activity at 9 hours, suggesting this band to likely have also a 9S-LOX specificity. Attempt to assess specificity by HPLC analysis of LOX isoform activity of the corresponding bands collected from IEF gels did not raise significant data, as compared to the soybean LOX band (pI 7.4) used as a control which displayed a very strong 13-LOX activity (data not shown). The weak signal recorded

with cotton LOX bands may likely result from a too weak amount of LOX protein loaded in the lanes.

Our results also indicate that increases in LOX activity were likely regulated at transcriptional level (Fig. 5a). However, at least two LOX genes (one encoding the neutral form and the other encoding the acidic ones) would be up-regulated in response to the avirulent race 18 of *Xcm*, but we do not know yet if their homology and size were close enough to account for a unique signal in RT-PCR and hybridizations (Fig. 5a).

Previous ultrastructural observations of *Xcm*-infected leaves from susceptible cotton plants (Dai *et al.*, 1996) revealed that chloroplasts were organelles early disorganised during disease, coinciding with the apparition of chlorosis. The lipid peroxidation observed during the interaction with the virulent race 20 of *Xcm* was late and weak, concomitant with the appearance of chlorosis, but observed 2 days before water loss and tissue necrosis (Fig. 2 and 3a). A detailed analysis of the peroxidative process revealed that hydroperoxides were almost exclusively of 9 S type, reflecting a specific LOX origin for this production. Such an activity has been characterized in the corresponding extracts (Table 2 and Fig 4a). In this case, *Ghklox1* gene was faintly expressed between 4 and 15 h pi, which might account for the appearance of a weak activity of 9 S specific LOX between 2 and 3 days pi (Fig 4a and Table 2).

Taking together the present results give evidence for a crucial role of 9S LOX-mediated lipid peroxidation in the execution of HR cell death in cotton. These data corroborate those previously reported on tobacco leaves (Montillet *et al.*, 2002, Rustérucci *et al.*, 1999) and on potato cells (Göbel *et al.*, 2001), and need to be completed by an anti-sense approach to ensure that limitation of 9-LOX activity prevents HR development.

One point to be elucidate is the role of the LOX isoforms activated during the cotton *Xcm*-induced HR. The biological roles of 9-HFA are far less understood, although functions in plant defense -signalling or antimicrobial activity - were reported (Kolomiets *et al.*, 2001 ; Weber *et al.*, 1999). Further LOX immunolocalization will help to visualize the subcellular distribution of these proteins during the incompatible interaction. If the involvement of the 9S-LOX (pI 4.6 isoform) at 24 hours in the execution of hypersensitive cell death can be strongly suggested, the role of the pI 7.4 isoform appearing 9 hours pi remains unknown. Although associated with a peak of intense LOX activity, it did not correlate with water loss, nor with measurable levels

of HFA. However the 9-HFA may be weakly produced (at level below the detection limits of our technique) and/or rapidly metabolized via non-reducing pathways. Some of these potent generated molecules have a possible phytoalexin-like or signalling function (Weber *et al.*, 1999). Recently, LOX free fatty acid substrates were suggested to be released through a putative lipid acyl hydrolase (LHA) (Dhont *et al.*, 2000; Göbel *et al.*, 2001) from the chloroplast envelopes (Rustérucchi *et al.* 1999), the main source of polyunsaturated fatty acids (Blée and Joyard, 1996). Although visible modifications of chloroplasts were detected microscopically later (around 12 hours pi, Daï *et al.*, 1996), the role of a putative LAH in the cotton-*Xcm* system has to be investigated.

The place of free radicals in triggering or executing HR has been a source of interest (Heath, 2000). In the present work, we highlighted the role of the lipid hydroperoxide-generating process in hypersensitive *versus* disease cell death. Through which signalling pathway this LOX-dependent mechanism operates still remains debatable. Among molecules that are known to be involved in LOX activation, SA (Schenk *et al.*, 2000; Weichert *et al.*, 1999), MeJA (Rustérucchi *et al.*, 1999) and H₂O₂ (Maccarrone *et al.*, 2000) are putative candidates that are currently under investigation in cotton. Whether H₂O₂ or SA, accumulating in cotton HR (Martinez *et al.*, 1998, 2000), triggers LOX gene transcription also raises the question of the occurrence of MeJA generation during this incompatible interaction.

Experimental procedures

Bacterial strains

Xanthomonas campestris pathovar *malvacearum* (*Xcm*) (races 18 and 20) was maintained at 30° C on YPGA_gar (0.5 % w/v yeast extract, 0.5 % w/v bacteriological peptone and 0.5 % w/v glucose as a carbone source, solidified with 1.5 % w/v agar Difco, Detroit, MI) in distilled water. Bacteria for inoculation were grown in 150 ml of YPG medium in an shaking incubator at 150 rpm/min at 30 °C. After approximately 18 h of growth, cultures were washed once with sterile water by centrifugation at 10,000 g for 10 min to remove nutrients and exopolysaccharide, and then the bacterial pellet was then resuspended in sterile water and adjusted to 10⁸U.F.C/ml.

Plant growth, inoculation and treatments

Cotton plants (*Gossypium hirsutum* cv. Reba B-50 (Allen x stoneville 2B)), similar to the 101-102 B line, contains the B₂B₃ genes for resistance to all races of *Xcm*, including race 18, except race 20 (Hillocks 1992; Innes 1983). Plants were grown in a greenhouse under natural light at 30/25 °C light/dark cycle with relative humidity averaging 80 %. These conditions were shown to favor bacterial development. The bacterial suspension 10⁸ U.F.C./ml, or sterile water for control, was injected into intercellular areas of 10 days-old cotyledons using a needles syringe. So far, two interactions were tested, the incompatible Reba B-50/*Xcm* 18 and the compatible Reba-B50/*Xcm* 20. Necrosis was assessed from changes with time of cotyledon water content, and expressed as % of initial fresh matter (FM).

Hydroxy and hydroperoxy fatty acid extraction and analysis

Free and esterified hydroxy and hydroperoxy fatty acids {H(P)ODE and H(P)OTE} were analysed by HPLC as free hydroxy fatty acids (HFA), according to the previously described method (Rustérucchi *et al.*, 1999). Enantiomeric composition of each isomers was performed as described in the same reference.

Evaluation of specific lipoxygenase activities in cotyledon extracts

Cotton extracts were prepared according to the procedure described by Rustérucchi *et al.* (1999) on one gram of frozen cotyledon tissues. The extract (0,5 ml) was incubated for 20 min at 25°C with 1ml of 250 mM sodium phosphate buffer (pH 7) and 5 µl of an ethanolic solution of linoleic acid (100 mM). The LOX reaction was stopped by addition of 70 µl of HClO₄ (12N), and hydroperoxy fatty acids were extracted in 2 ml of hexane. After vigorous shaking, the absorbance at 234 nm of the upper organic phase was measured (spectrophotometer, Uvikon 922 ; Kontron, Marseille, France) against a blank containing hexane. LOX activity was expressed in picokatal mg⁻¹ protein using a molar extinction coefficient for conjugated dienes of 25,000 M⁻¹. cm⁻¹.

Regiospecificity and enantioselectivity of lipoxygenase activities in cotyledon extracts

Determination of regiospecificity of LOX activity in the same cotyledons extracts was assessed on linoleic acid as substrate by measuring the 13-HODE/9-HODE ratio. The reaction was performed as described above, except that it was stopped by adding 200 µl of 1 N NaOH and 500 µl of 5 % (w/v) NaBH₄ in 0.2 N NaOH. After addition of the internal reference (100 nmol of 15-HEDE), the pH of the mixture was adjusted to 4.5

with few drops of 12 N HClO₄. HFA were then extracted in 1.5 ml of hexane/diethyl ether 70/30 (v/v) and analyzed by straight phase HPLC. Thirteen and 9 HODE were then collected individually and their enantiomeric composition was analysed after separation of the *S* and *R* enantiomers on a chiral cell column according to Rustérucci *et al.* (1999). The soluble protein content of the extracts was determined according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Vertical Isoelectric Focusing (IEF)

Vertical IEF gel electrophoresis, with ampholytes in the range pH 3-10 (Serva Biochemical), was performed using a BioRad mini protein gel system (70 mm x 80 mm) according to procedure of Robertson *et al.* (1987) with 20 mM acetic acid as anode solution and 25 mM NaOH as cathode solution. Samples (25 µg total protein / lane) were loaded on the basic part of the gel and focusing was conducted for 1h30 at 200 V followed by 2.5h at 500 V. During IEF, the gel temperature was maintained at 4°C. After IEF was completed, the gels were rinsed in 250 mM sodium phosphate buffer (pH7), and stained for LOX activity by the method of Smith *et al.* (1997), with minor modifications. Just before staining, linoleic acid (100µl) and o-dianisidine (3,3'-dimethoxy benzidine) (20 mg) resuspended in 15 ml absolute ethanol were added to 85 ml of 250 mM sodium phosphate buffer (pH 7) with catalase at 1mg/ml. Gels were incubated overnight in the dark in the presence of the reaction mixture, under gentle agitation at room temperature. After staining was completed, the gels were rinsed in distilled water. Isoelectric points were estimated from the position of marker-proteins a separate part of the gel, stained with Coomassie Brilliant Blue G 250.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from water-treated and *Xcm*-infected cotyledons by the guanidium thiocyanate / CsCl method described by Corre *et al.* (1996). In order to determine the point of maximal LOX expression, a time course experiment in which LOX transcript levels were measured at different times after inoculation was conducted. RNA (7.5 µg) were reverse-transcribed with StrataScript Reverse Transcriptase (Stratagene, France) using oligo-(dT)₁₈ as primer. PCR primers were designed following a comparison of deduced amino acid sequences from the bacterial-induced cotton LOX *GhkLox1* gene (accession n° AF361893, Assigbetsé *et al.*, 2002) and other plant LOX gene sequences obtained from databases. Among these,

two conserved regions were selected to design the cotton LOX-specific sense primer K3 (5'-GCATGGAGGACTGATGAAGAGTT-3') and the antisense primer K6 (5'-GCATGGAGGGCTGAAGCTATCCAGAT-3'). The PCR reaction mixture of 25 μ L contained the PCR polymerase mix (Qiagen, France), 20 picomol of each primer, and 15 ng of each RT reaction. Amplification was performed with an initial denaturation step of 94° C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation (30 sec at 94° C), annealing (30 sec at 56° C) and extension (1 mn 30 sec at 72° C). After the last cycle, PCRs were extended for 10 min at 72°C. PCR products were electrophoresed on 1,5% agarose gels in TAE buffer 1X, and the band intensities within each experiment were compared after ethidium bromide staining. They were blotted and probed with LOX cDNA to confirm their LOX identities.

RNA gel blot analysis

The time-course studies as described previously were performed using the Northern-Blot analysis. Total RNAs were resolved by electrophoresis in 1.2% agarose-formaldehyde gels, transferred and UV cross-linked to nylon Hybond-N+ filters (Amersham Pharmacia, France). Equal loading of RNA samples and uniform transfer onto filters were confirmed by visualizing RNA stained with methylene Blue. The membranes were probed with the bacterial-induced cotton LOX cDNA (Accession n°361893) [α -³²P] dCTP-labelled by the random priming method (Amersham Pharmacia France). The hybridizations were performed overnight at 42°C in a hybridization buffer containing 50% formamide, 5 x SSC, 5 x Denhardt's solution (1 x Denhardt's solution is 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, and 0.02% BSA), 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8. Following hybridizations, the filters were washed 2 X 30 min in 2 x SSC, 0.1% SDS at room temperature, then in 1 x SSC, 0.1% SDS, for 45 min at room temperature, prior to autoradiography. The blots presented are representative examples from two independent experiments.

Light microscopy

Semi-thin sections (1 to 2 μ m) made on epon-embedded fragments from plant material prepared as described by Dai *et al.* (1996) were observed under light microscope (Leitz, Diaplan) after staining with toluidine blue 1% in borax (w/v) pH 8.9. Infected tissues were observed 24 h and 72 h pi for the incompatible and

compatible interactions, respectively. Control consisted in water-infiltrated cotyledons.

Acknowledgements

We thank Pr. M. Essenberg (Oklahoma State University, USA) and Dr. A. Clérivet (IRD) for critically reading the manuscript. A. Jalloul was supported by a Ph D grant from University of Damascus (Syria); her work was funded by IRD.

Abbreviations

18:2, linoleic acid; 15-HEDE, 15-hydroxy-11,13(*Z,E*)-eicosadienoic acid; 9-HODE, 9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid; 13-HODE, 13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid; 9-HOTE, 9-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid; 12-HOTE, 12-hydroxy-9,13,15-octadecatrienoic acid; 13-HOTE, 13-hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid; 13-HOTE, 13-hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid; 16-HOTE, 16-hydroxy-9,12,14-octadecatrienoic acid; HPODE, hydroperoxy-octadecadienoic acid; HPOTE, hydroperoxy-octadecatrienoic acid; HFA, hydroxy fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

**Molecular cloning and characterization
of a bacterial-induced lipoxygenase encoding cDNA
from cotton.**

Assigbetsé K., Jalloul A., Delannoy E., Daniel J.F., Marmey P., Geiger J.P. et Nicole M.

DNA Sequence, *in press*

Abstract

We have cloned a cDNA fragment encoding a lipoxygenase from cotton cotyledon mRNA by RT-PCR and 5'-RACE procedures. It was isolated from cotton undergoing the Hypersensitive Reaction (HR) during the incompatible interaction with Xanthomonas campestris pv. malvacearum race 18. It contained a presumptive coding sequence of a 2598 bp and 96 bp of 5' untranslated sequence and 144 bp including a polyadenylation signal and poly (A) tail at the 3' end. It encoded a protein (GhkLox1) of 866 amino acid residues with a predicted molecular mass of 99 kDa and a pI of 6.42. It exhibited all of the sequence characteristics of a plant lipoxygenase. Both the nucleotide and the amino acid sequences displayed the highest sequence identities with the plant elicitor- and pathogen-induced lipoxygenases, especially with POTLX-3 gene from potato (Solanum tuberosum), LOX1 from Arabidopsis thaliana, LOX1 from tobacco (Nicotiana tabacum) and LOX1 from tomato (Lycopersicum esculentum).

```

M L S H L L H A V A G D D N G N K K M K P E K I K G T V V V 30
ATGCTGAGCCATTGCTCCACGCCGTAGCCGGTAGCACAATGGGAACAAGAAGATGAAACCGGAAAAGATCAAAGGAAGCTGGTGGT 90
M Q K N V L D F N D F H A S F L D G G F H E L L G K R V S F Q 60
ATGCAGAAAAATGTTTGGATTCAATGACTTCCAATGATCTTTCTTGTATGGCTTTTCATGAGCTGTTAGGCAAAGAGTTTCATTTCAG 180
L I S S Q Q H V D F L A D N G L Q G K L G G K E A Y L E D W N S T E 90
CCTATCAGTCTCAACATGTCGATGCTGATAATGGTTGCAAGGAAAGCTGGGGAAGAAGCATAATTTGGAGGACTGCAACTCTACAGAA 270
T S A V A G E S K F D V N F D F E E E I G L P G A F L I K N 120
ACATCGGCAGTGGCCGGAGAATCTAAATTCGACGTTAACTTTGATTTGGAGGAGGAAATCGGATTAACCGGAGCTTTCTCTCAATAAAAAA 360
N H H S E F Y L D K T L T L E H V P G H G R F H F V C N S W V 150
AATCATCATAGTGTAGTTTACCTCAAACCTTCACTCTCGAACAATGTTCCAGGTCATGGTCGGTTTCACTTTGCTGCAATCTTGGGTT 450
Y P D R K K Y D N P R V P E P T N K T Y L P H D M P K P L L Q Y 180
TATCCCGACAAGAAATACGATAACCCCTCGAGTTTCTTCACTAACAAAGCAGTATCTTCCGCATGACATGCCAAGCCGCTGCTTCAATAC 540
R E Q E L M T L R G N G Q G E L Q E W D R V Y D Y A Y Y N D 210
AGAGAACAAGAGCTGATGACCTTGAGAGGCAATGGCCAAGGAGAGCTTCAAGAATGGGATCGTGTCTATGACTATGCTTATTACAATGAT 630
L G N P D K G P E Y A R P V L G G S V K Y P Y P R R G R T G 240
TTGGGGAACCCCGACAAGGGCCCGAATAACCCCGCCCGTCTTCCGAGGTTCTCAAGTACCCCTACCCCTAGAGGACGAGGACTGGT 720
R P P A K S D P K T E S R I P L L M S L N I Y V P R D E R F 270
AGACCTCCGGCCAAGTCAGATCCCAAGACTGAGAGTAGGATACCCTTTTGTATGAGCTTAAACATTTATGTTCCAAGAGATGAACGATTT 810
G H L K M S D F L A Y A L K S I V Q F I V P E L Q D L T D K 300
GGACACTTGAAGATGTCGGATTTCCTTGCCTTATGCACTGAAATCTATAGTTCAATTCATAGTCCAGAGCTTCAAGATCTAACTGATAAA 900
T H N E F D S L E D V L K L Y Y G G V K L P S G P L L D N I 330
ACTCACAACGAATTTGACTCATGGAGGATGTTCTTAACTCTACTATGGTGGAGTTAAGCTTCCCTTCCGACCTTTGCTTGCATGACATC 990
I N N I P L E M L K E I F R T D E A Q L L K F P V P Q V I Q 360
ATCAACAACATCCCTTGGAGATGCTCAAGAAATTTCCGAACCTGATGAAGCCCAACTGTTAAATTTCTGTGCCCAAGTCATTCAA 1080
D S K T A W R T D E F A R E M L A G V N P V I I R L L Q E 390
GACAGTAAGACTGCATGGAGGACTGATGAAGAGTTTGCCAGAGAAATGCTGGCTGGAGTTAACCTGTTATAATCCGCTTCTTCAAGAA 1170
F S P A S N L D P K V Y G N Q N S A I T K E H I E H N L E G 420
TTTTCTCCAGCAAGCAACCTAGCTTAAAGTATATGGTAATCAAACAGTGGCCATAACCAAGGAACACATTTAGCACAACCTAGAGGGA 1260
L T V E E A L R T N R L F I L D H H D S L M P Y L R R I N T 450
CTAACAGTAGAAGGACTGAGAACCAACAGGTTATTCATATTTGGATCATGATGACTTATGCGGTACCTGCGGAGGATAAACACT 1350
T T T K T Y A S R T I L L R N D G T T L K P L V I I R L L P 480
ACGACAACCAAGACTTATGCGTCTCGAACCATCTTGCTTTTACGCAATGATGGCACTTTGAAGCCATTGGTGATGAAATGAGTTTGCCA 1440
H P N G D Q L G A V N K V Y T P A E H G V E G S I W Q L A K 510
CATCCGAACGGGATCAATTTAGCTGTTAACAAGGTTTACACACCTGAGAGTGGAGTTGAGGTTTCAATATGGCAGTTGGCTAAA 1530
A Y V A V N D S G A H Q L I S H W L N T H A A M E P F V I A 540
GCTTATGTTGCCGTAATGACTCTGGAGCCATCAACTCATAAGCCATTGGTTGAACACTCATGCAGCAATGGAGCATTTCGTGATTGCA 1620
T N R Q L S V H P I Y K L L Y P H F R K D I M N I N A F A R 570
ACGAACCGACAACCTAGTGTGTTTCATCCAATTTATAAGCTTCTCTATCTCTCACATCCGGGACACGATGAACATCAATGCCCTTTGCTAGG 1710
Q I L I N G G V L E L T V F P G K Y A M E M S S V I Y K S 600
CAGATTCTGATTAATGAGGATGGTGTCTCGAAATTAACAGTTTTCCTCGAAAGTATGCAATGGAAATGTCATCAGTTATTACAAGAGT 1800
W N L L D Q A L P R D L K K R G V A V D D K S G P H G L R L 630
TGGAAATTTGCTTGACCAGGCACTTCCCTAGAGATCTCAAGAAGAGAGGAGTTGCAGTTGATGATAAGAGTTTACCACATGGTCTTCGTTT 1890
L I K D Y P Y A V D G L E I W F A I E K W V R D Y C S F Y Y 660
CTGATAAAGATTAATCCATATGCTGTTGATGGACTGGAGATTTGGTTTGAATTTGAAAATGGGTGAGAGATATTGCTCCTTCTACTAC 1980
K T D E M V Q Q D P E L Q A W W K E L R E E G H G D K K D E 690
AAGACCGATGAAATGGTCCAACAAGACCTGAACTTCAAGCCTGGTGGAAAGAATCCGAGAGGAGGTCATGGCGACAAGAAAGACGAG 2070
P W W P K M Q T R E E L I D S C T I I I W V A S A L H A A V 720
CCATGGTGGCTAAAATGCAGACTCGAGAAGAGTTGATCGATTTGACCAATATCATATGGGTGGCTTCCAGCTTCCATGAGCAGCT 2160
N F G Q Y P Y A G Y L P N R P T I S R R F M P E K G T P E Y 750
AACTTTGGCCAATATCCTTATGCAAGGCTACCTCCCGAACCGACCGACTATAAGTTCGTCGGTTTCATGCTGAGAAAGGAACACCAGAATAC 2250
T E L E S N P D K V F L K T I T A Q L Q T L G I S L I E I 780
ACAGAACTAGAGTCCAACCCGGACAAGGTTTCTTGAACAACAATAACTGCTCAACTGCAGACACTCTGGGAATATCCTTGATAGAAATC 2340
L S R H S S D E V Y L G G Q R A S P E W T S D E T P L A A F D 810
CTATCAAGGCAATTCGTGAGATGAGTTTATCTGGGGCAGAGAGCCAGCCCTGAATGGAGCTGAGAGCAACCCCACTTGCAGCTTTCGAT 2430
E F G K R L T G I E E R I V E M N N D E Q L K N R V G P V N 840
GAATTTGGGAAGCGGCTTACCGGGATAGAGGAACGGATTTGATAGAGTGAACAACGATGAGCAGTTGAAGAACCCTGTTGGTCCGGTCAAT 2520
M P Y T L L Y P T S E G G L T G K G I P N S V S I * 866
ATGCCATACACATTTGTTATCCAACCTAGTGAAGGTGGACTTACGGGCAAGGGAATTTCAAACAGTGTCTCAATCTGATGCATTTATCTT 2610
CAAAATATTAAAAATGGCCATTAAGTCTTTTAAAAATATACCATTGTAAACAAATAAAAGTTTGCTATTAGTGAACAAATAAAG 2700
TTTTATAGATATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2739

```

FIGURE 1 : Nucleotide sequence of a full-length GHKLOX1 cDNA and its deduced amino acid sequence (GhkLox1). Grey box indicated the PLAT (Polycystin-1, Lipoxigenase, Alpha-Toxin) domain. Boxed sequences correspond to lipoxigenases iron-binding regions signatures. Asterisks (*) indicate the stop codon. The 3' untranslated regions is shown in lowercase letters.

Introduction

Bacterial blight, caused by Xanthomonas campestris pv. malvacearum (Xcm) is one of the most important diseases of cotton (Gossypium hirsutum L.) (Smith) Dye. Although resistant varieties are widely used, bacterial blight remains a potentially serious disease in cotton growing regions. Resistance to Xcm is determined by at least 16 distinct R genes (De Feyter *et al.*, 1993). The cotton resistant cultivar Réba B50 contains the B2B3 R genes to the avirulent race 18 of Xcm. One of the efficient forms of cotton resistance against Xcm is the HR (Nicole *et al.*, 1998) expressed as a rapid plant cell death and characterized by peroxidase activation (Assigbetsé *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 1998), production of reactive oxygen species (Martinez *et al.*, 1998), accumulation of salicylic acid (Martinez *et al.*, 2000), and production of flavonoid (Dai *et al.*, 1996) and phytoalexin (Essenberg *et al.*, 1992).

One class of proteins thought to have a significant role in plant-microbe interactions are lipoxygenase (LOX) (Rancé *et al.*, 1998; Burow *et al.*, 2000). Plant LOX (linoleate: oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) are non-heme iron-containing enzymes that catalyze the incorporation of molecular oxygen into polyunsaturated fatty acids such as linolenic and linoleic acids (Siedow, 1991 ; Feussner *et al.*, 2001). LOX activity has been suggested to be implicated in a wide range of plant physiological processes, such as wounding (Saravitz and Siedow, 1996), growth and development (Matsui *et al.*, 1999; Porta *et al.*, 1999; Kausch and Handa, 1997; Feussner *et al.*, 1996; Bachem *et al.*, 1996; Wisniewski *et al.*, 1999; Kolomiets *et al.*, 2001) and plant microbe-microbe interactions (Véronési *et al.*, 1996; Rancé *et al.*, 1998; Burow *et al.*, 2000; Jalloul *et al.*, 2002 ; Rustérucci *et al.*, 1999). In the present work, we report the isolation and characterization of a cDNA encoding LOX from cotton undergoing HR after infiltration with Xcm race 18.

Materials and Methods

Plant material

The cotton cultivar Réba B50 resistant to Xanthomonas bacterial blight is cultivated under greenhouse optimal conditions. Two-week old cotyledons were infiltrated at multiple sites with the bacterial suspension (10^8 CFU/ml) prepared from the avirulent Xcm race 18. This interaction resulted in a HR. Cotton cotyledons were harvested for RNA isolation 12 h after infiltration with bacteria.

Q43800	53	SLEIISVSNADPANGLOCKRKAAYLENLNLNSTPIAAGESAFRITFDWIDDEFVPGAFIKNLHFSEFFLKSLLTLEDV
Q9FT17	53	SFQLIENS-VHDANGLBGLSNPAYLENHINITPVVAGESSTFSVTFDWDDEFVPGAFIKNLHFSEFFLKSLLTLEDV
Q43191	55	SLQLISVVHADPCNSLQCKRRSNPAYLEKLLTGTSLVAGESAFDVFDFED-IGVPGAFIINNHFNFYFLKSLTLEDV
AF361893	58	SFQLISSQHVADANGLQCKLKGKAYLEDNSTETSAVAGESKFDVDFDEE-IGVPGAFIKNNHSEFYLLTLEDV
Q06327	55	TLRLVSSDVTDSENGSKKLGKAAHLEDVITITISLTAGESAFKVTFDYFTD-FGYPGAFIIRNSHFSEELLKSLTLEDV
Q43800	133	PNHGKVFVVCNSWVYFANNKSDRPFANQAYLPSSETPDTLRKYRENELVALRGDGTGKLEEWDRVYDYAYYNDLGDGDPK
Q9FT17	132	PNHGKVFVVCNSWVYFASKYKSDRPFANQAYLPSSETPELRLKYRENELVALRGDGTGKLEEWDRVYDYAYYNDLGDGDPK
Q43191	134	PNHGNVFVVCNSWVYFASKYKSERPFANQAYLPSSETPELRLNYREKELVNLRCNCGKLEEWDRVYDYALYNDLGDGDPK
AF361893	137	PGHGRVFVVCNSWVYEDKKYDNPRVFTTKTYLPHDMPKPELQYRQELTLRGNCGGELQEWDRVYDYAYYNDLGNFDPK
Q06327	134	PGHGRVFVVCNSWVYFASKYTTDRVFFSNKTYLPHETPATELKYREELVSLRGTGEGLEEWDRVYDYAYYNDLGVDPK
Q43800	213	GQDLSFVPLGGSQVYPRRGRTGRKFTKIDPMSERIPILMSLDIYVPRDERFGHVKMSDFLTFALKSISQLLLEPFKA
Q9FT17	212	GQEYAFVPLGGSQVYPRRGRTGRKFTKIDPMSERIPILMSLDIYVPRDERFGHVKMSDFLTFALKSISQLLLEPFKA
Q43191	214	GKQYAFVPLGGSQVYPRRGRTGRKFTKIDPMSERIPILMSLDIYVPRDERFGHVKMSDFLTFALKSISQVFLIPEFOA
AF361893	217	GPEYAFVPLGGSQVYPRRGRTGRKFTKIDPMSERIPILMSLDIYVPRDERFGHVKMSDFLTFALKSISQVFLIPELOD
Q06327	214	NP--FVPLGGSQVYPRRGRTGRKFTKIDPMSERIPILMSLDIYVPRDERFGHVKMSDFLTFALKSISQVFLIPEFOA
Q43800	293	LFDSFHNFEFDSFEDVLLKLYEGGKLEQGGPLKAITDSTPLELLELRLSDEGGLKLYFTPOVIQEDKTAIRTDDEEFGRM
Q9FT17	292	LFDSFHNFEFDSFADVLLKLYEGGKLEQGGPLKAITDSTPLELLELRLSDEGGLKLYFTPOVIQEDKTAIRTDDEEFGRM
Q43191	294	LFDSFHNFEFDSFEDVLLKLYEGGKLEQGGPLKAITDSTPLELLELRLSDEGGLKLYFTPOVIQEDKTAIRTDDEEFGRM
AF361893	297	LFDSFHNFEFDSFEDVLLKLYEGGKLEQGGPLKAITDSTPLELLELRLSDEGGLKLYFTPOVIQEDKTAIRTDDEEFGRM
Q06327	291	LFDSFHNFEFDSFEDVLLKLYEGGKLEQGGPLKAITDSTPLELLELRLSDEGGLKLYFTPOVIQEDKTAIRTDDEEFGRM
Q43800	373	LAVNPVTLISREQEFPEKSKLDPKLYGNQNSTITREQIEDKLDGLTDEIKTNRLEILNHHDIIMPYLRRLNVTNTFT
Q9FT17	372	LAVNPVTLISREQEFPEKSKLDPKLYGNQNSTITREQIEDKLDGLTDEIKTNRLEILNHHDIIMPYLRRLNVTNTFT
Q43191	374	LAVNPVTLISREQEFPEKSKLDPKLYGNQNSTITREQIEDKLDGLTDEIKTNRLEILNHHDIIMPYLRRLNVTNTFT
AF361893	377	LAVNPVTLISREQEFPEKSKLDPKLYGNQNSTITREQIEDKLDGLTDEIKTNRLEILNHHDIIMPYLRRLNVTNTFT
Q06327	371	LAVNPVTLISREQEFPEKSKLDPKLYGNQNSTITREQIEDKLDGLTDEIKTNRLEILNHHDIIMPYLRRLNVTNTFT
Q43800	453	YASRTLLFLQDNGTLPKVALELSLPHDPGDFGAVSKVYTPADQVEGSEWQAKAVAVVNDSCGHQLSHVLNTHAAAE
Q9FT17	452	YATRTLLFLQDDGTLPKVALELSLPHDPGDFGAVSKVYTPADQVEGSEWQAKAVAVVNDSCGHQLSHVLNTHAAAE
Q43191	453	YASRTLLFLQDNGTLPKVALELSLPHDPGDFGAVSKVYTPADQVEGSEWQAKAVAVVNDSCGHQLSHVLNTHAAAE
AF361893	456	YASRTLLFLQDNGTLPKVALELSLPHDPGDFGAVSKVYTPADQVEGSEWQAKAVAVVNDSCGHQLSHVLNTHAAAE
Q06327	450	YASRTLLFLQDDGTLPKVALELSLPHDPGDFGAVSKVYTPADQVEGSEWQAKAVAVVNDSCGHQLSHVLNTHAAAE
Q43800	533	PFVIATNRQLSVVHPHFKLLPHFRDTMNINALARQILINGGGLLELTVFPKAYAMEMSSVYK-DVFPPEQALPDLIK
Q9FT17	532	PFVIATNRQLSVVHPHFKLLPHFRDTMNINALARQILINGGGLLELTVFPKAYAMEMSSVYK-DVFPPEQALPDLIK
Q43191	533	PFVIATNRQLSVVHPHFKLLPHFRDTMNINALARQILINGGGLLELTVFPKAYAMEMSSVYK-DVFPPEQALPDLIK
AF361893	536	PFVIATNRQLSVVHPHFKLLPHFRDTMNINALARQILINGGGLLELTVFPKAYAMEMSSVYK-DVFPPEQALPDLIK
Q06327	529	PFVIATNRQLSVVHPHFKLLPHFRDTMNINALARQILINGGGLLELTVFPKAYAMEMSSVYK-DVFPPEQALPDLIK
Q43800	612	RGVAVEISSSHLRLLLKDYPIAVDGLLETSASKSVTEYCNFYKSDDAVQKRELQAWWKELRREGHGDKKDEPWF
Q9FT17	611	RGVAVEISSSHLRLLLKDYPIAVDGLLETSASKSVTEYCNFYKSDDAVQKRELQAWWKELRREGHGDKKDEPWF
Q43191	612	RGVAVEISSSHLRLLLKDYPIAVDGLLETSASKSVTEYCNFYKSDDELVLKRELQAWWKELRREGHGDKKDEPWF
AF361893	615	RGVAVEISSSHLRLLLKDYPIAVDGLLETSASKSVTEYCNFYKSDDELVLKRELQAWWKELRREGHGDKKDEPWF
Q06327	609	RGVAVEISSSHLRLLLKDYPIAVDGLLETSASKSVTEYCNFYKSDDELVLKRELQAWWKELRREGHGDKKDEPWF
Q43800	692	KMQTVQELIDSCITLWASALHAAVNFQYYPYAGYLPNRPTLSRREMEPGSPPEYELKTNPKKAYLKTIPQLQTLIG
Q9FT17	691	KMQTVQELIDSCITLWASALHAAVNFQYYPYAGYLPNRPTLSRREMEPGSAEYELKRNPNVLEKTIIPQLQTLIG
Q43191	692	KMQTVQELIDSCITLWASALHAAVNFQYYPYAGYLPNRPTLSRREMEPGSPPEYELKTNPKKAYLKTIPQLQTLIG
AF361893	695	KMQTVQELIDSCITLWASALHAAVNFQYYPYAGYLPNRPTLSRREMEPGSPPEYELKTNPKKAYLKTIPQLQTLIG
Q06327	689	KMQTVQELIDSCITLWASALHAAVNFQYYPYAGYLPNRPTLSRREMEPGSPPEYELKTNPKKAYLKTIPQLQTLIG
Q43800	772	ISLIEELSRSSDEYVLGQRDSPEITKQEPISAFERFCKKLSDEDOIQMNGG-KKWNRSQPNVYPYTLFPSEGG
Q9FT17	771	ISLIEELSRASDYLQQRDSPEITKQEPISAFERFCKKLSDEDOIQMNGG-KKWNRSQPNVYPYTLFPSEGG
Q43191	772	ISLIEELSRASDYLQQRDSPEITKQEPISAFERFCKKLSDEDOIQMNGG-KKWNRSQPNVYPYTLFPSEGG
AF361893	775	ISLIEELSRSSDEYVLGQRDSPEITKQEPISAFERFCKKLSDEDOIQMNGG-KKWNRSQPNVYPYTLFPSEGG
Q06327	769	ISLIEELSRSSDEYVLGQRDSPEITKQEPISAFERFCKKLSDEDOIQMNGG-KKWNRSQPNVYPYTLFPSEGG
Q43800	851	LTGNGIPNSVSI 862
Q9FT17	851	LTGNGIPNSVSI 862
Q43191	851	LTGNGIPNSVSI 862
AF361893	854	LTGNGIPNSVSI 865
Q06327	848	LTGNGIPNSVSI 859

FIGURE 2 : Sequences similarities between GhkLox1 (AF361893) and other sequenced plants lipoxygenases. The alignment was generated using the ClustalW (1.8) program (Thompson *et al.*, 1994). The compared LOXs sequences are: LOX1_ARATH (Q06327) from A. thaliana (Melan *et al.*, 1993); LOX (Q9FT17) from L. esculentum (Pan *et al.*, 2000); LOX1 (Q43800) from N. tabacum (Veronisi *et al.*, 1996); and POTLX-3 (Q43191) from S. tuberosum (Kolomiets *et al.*, 2000).

RNA extraction and analysis

RNA for the RT-PCR was extracted from infected cotyledons according to Plant Rneasy Kit extraction protocols (Qiagen, France). For the Northern-Blot analysis, total RNA was extracted following the protocol reported by Logemann *et al.* (1987). Northern blot analysis was performed with 20 µg of total RNA per lane, electrophoresis in 1,2% agarose- formaldehyde gels, transferred and UV cross-linked to nylon Hybond-N+ filters (Amersham Pharmacia, France). The membranes were probed with GHKLOX1 [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP-labelled by the random priming method (Amersham Pharmacia France). The hybridizations were performed overnight at 42°C in a hybridization buffer containing 50% formamide, 5 x SSC, 5 x Denhardt's solution (1 x Denhardt's solution is 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, and 0.02% BSA), 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8. Following hybridizations, the filters were washed 2 X 30 min in 2 x SSC, 0.1% SDS at room temperature, then in 1 x SSC, 0.1% SDS, for 45 min at room temperature, prior to autoradiography.

Isolation of lipoxygenase cDNA.

The cDNA isolation was carried out using RT-PCR. The full-length double strand cDNAs were generated by using the SMART PCR cDNA Synthesis reaction (Clontech, France) with 1 µg total RNA.

Based on the internal conserved regions of plants LOX two degenerated sense and antisense primers (Kom3F: 5'-GCRTGGAKGACYGATGAAGARTT-3' and Kom6R: 5'-GC-ATGRAGBGCDGAAGCDATCCAKAT-3') were constructed. Using these two primers, a PCR was performed under the following conditions: initial denaturation 94°C, 3 min; followed by 25 cycles of 94°C, 30 sec; 56°C, 30 sec; and 72°C, 1 min 30 sec. The 1,060 pb PCR fragment obtained was sequenced (Genome Express, Grenoble, France) and from this sequence two cotton specific internal sense (LoxK3F: 5'-GCATGGAGGACTGATGAA-GAGTT-3') and antisense (LoxK6R: 5'-GCATGGAGGGCTGAAGCTATCCAGAT-3') primers were designed. Subsequently, the 5' end of the cDNA was amplified using the combination of 5' SMART PCR primer (Clontech) and LoxK6R; as for the 3' end, it was obtained by using a sense LoxK3F and oligo dT primers. For both reactions the PCR was performed as following: initial denaturation 94°C, 3 min; followed by 30 cycles of 94°C, 30 sec; 56°C, 45 sec; and 72°C, 2 min 30 sec. The cotton specific 5' end LOX primer (5'-

```

Q43800      WQLAKAYA AV NDSGVHQLIS HWLNTHAAIE PFVIATNRQL SALHPIYKLL HPHFRET MNI NALARQILIN 572
Q9FT17      WQLAKAYA AV NDSGVHQLVS HWLNTHTVIE PFVIATNRQL SVLHPIHKLL LPHFRDTMNI NALARQILIN 571
Q43191      WQLAKAYVAV NDSGVHQLIS HWLNTHAAIE PFVIATNRQL SVLHPIHKLL HPHFRDTMNI NALARQILIN 572
AF361893    WQLAKAYVAV NDSGAHQLIS HWLNTHAAME PFVIATNRQL SVVHPIYKLL YPHFRDTMNI NAFARQILIN 578
Q06327      WQLAKAFVGV NDSGNHQLIS HWMQTHASIE PFVIATNRQL SVLHPVFKLL EPHFRDTMNI NALARQILIN 568
*****:. . * ***** **:* * **:* **:* * ***** **:* **:* **:* *****
Consensus   WQLAKA---V NDSG-HQL-S HW--TH---E PFVIATNRQL S--HP--KLL -PHFR-TMNI NA-ARQILIN

Q43800      WIASALHAAV NFGQYPYAGY LPNRPT 733
Q9FT17      WIASALHAAV NFGQYPYAGY LPNRPT 732
Q43191      WIASALHAAV NFGQYPYAGY LPNRPT 733
AF361893    WVASALHAAV NFGQYPYAGY LPNRPT 739
Q06327      WVASALHAAV NFGQYPVAGY LPNRPT 730
*:*:*:*:* *:*:*:* *:*:* *:*:*
Consensus   W-ASALHAAV NFGQYP-AGY LPNRPT

```

FIGURE 3 : Amino acid sequence comparison of the Histidines-rich regions of several LOXs. Numbers indicate the position of each block in the corresponding sequence; the two blocks are not contiguous. His residues underlined in the consensus line are those shown by mutagenesis to be required for enzyme activity (Steczko *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992). Alignment is with Arabidopsis LOX1 (Q06327) (Melan *et al.*, 1993), tomato LOX (Q9FT17) (Pan *et al.*, 2000), tobacco LOX1 (Q43800) (Véronési *et al.*, 1996), and potato POTLX-3 (Q43191) (Kolomiets *et al.*, 2000).

CGAA-CATATCCTTTCACCACCACCG-3') was then used with oligodT₁₈ primer to amplify the full-length cotton LOX cDNA by using the PCR conditions as above except that extension time was 4 min. The amplified product was cloned into pSTBlue-1 (Novagen, USA). The sequence was deposited in the GenBank sequence library under an Accession number **AF361893**.

Phylogenetic analysis

Sequences comparison and phylogenetic analyses were performed on amino acid sequences of published plants LOXs using the ClustalW 1.8 package (Thompson *et al.*, 1994) and the neighbor-joining program (Saitou and Nei, 1987).

Results

Characterisation of the LOX-encoding cDNA clone

The LOX cDNA described in this study and designated GHKLOX1, was isolated 12 h after infiltration of cotton cotyledons with Xcm. GHKLOX1 is 2835 bp long with 5' untranslated sequence of 96 bp, a presumptive coding sequence of 2598 bp and 141 bp of 3' untranslated sequence including a poly (A) tail. It encoded a predicted gene product (GhkLox1) of 866 amino acid residues (Fig. 1) with a calculated molecular mass of 99 kDA and a pI of 6.42.

The polypeptide sequence analysis revealed amino acid residues that are highly conserved among most plant and mammalian LOXs and those considered to be important for a functional enzyme (Fig. 1). Among these, a "histidine-rich" region including 6 conserved histidines (His-521, His-526, His-531, His-549, His-558 and His-717), a stretch of 9 amino acids (720 to 728) which appear unchanged in most LOXs, and the eight residues block GIPNSVSI at the C-terminal end (Fig. 2). Mutational analysis of human 5-LOX and soy LOX1 (Steckzko *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Boyington *et al.*, 1993) has shown that three of the His corresponding to residues 526, 531 and 717 and residues Asn-724, Ile-865 of GhkLox1 are involved in binding the iron atom essential for the enzymatic activity of lipoxygenases. When comparison was done between GhkLox1 and some sequenced plant Lox, the clustered His residues are in a region where 76 % of residues show complete identity. The other conserved His is in amino acid block where 93 % of residues display also complete identity in all five sequences (Fig. 3).

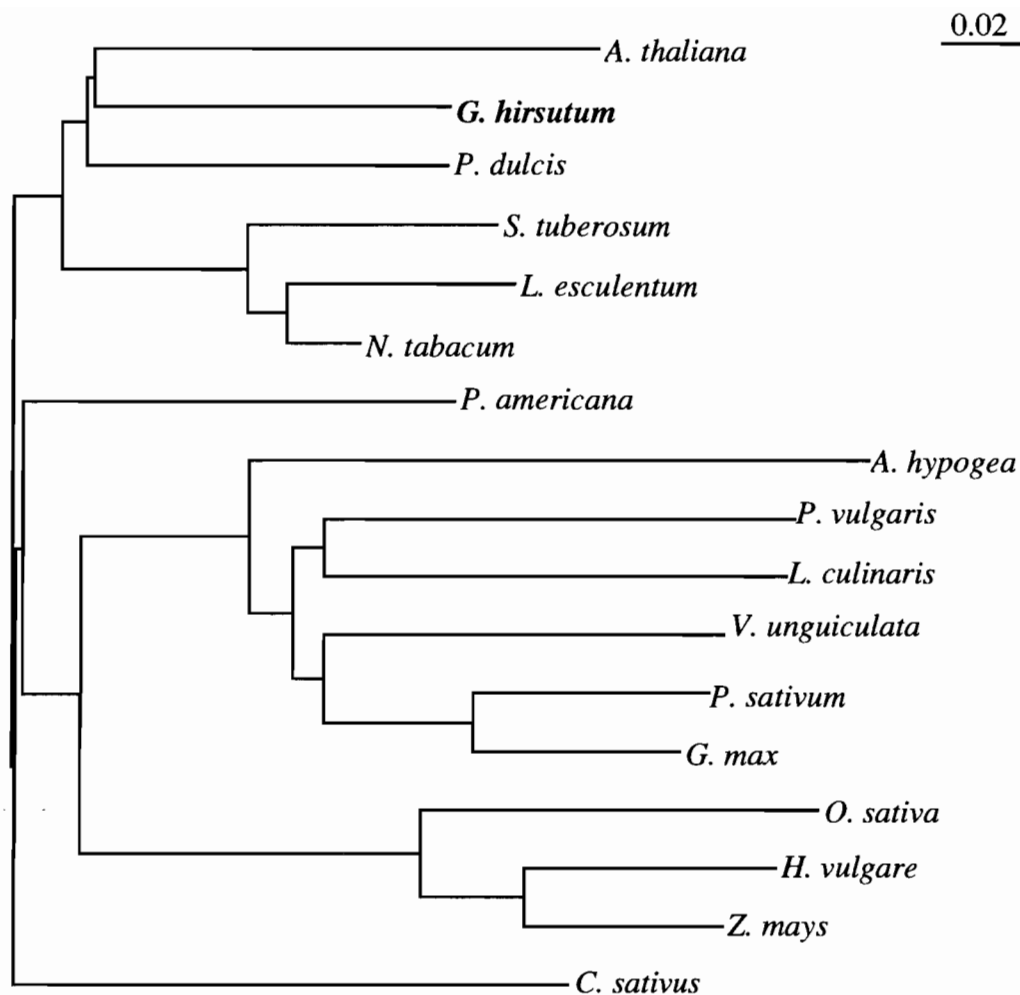


FIGURE 4 : Phylogenetic Tree of some plant lipoxygenase. The amino acid sequence of cotton Lox (*Ghklox*) is compared with related known plant LOXs. The data were organized into a phylogenetic tree with the ClustalW 1.8 program (Thompson *et al.*, 1994). This phylogenetic analysis shows that the cotton *Ghklox1* is closely related to the pathogen-induced potato Lox POTLX-3 (Q43191), Arabidopsis Lox (LOX1; Q06327), and to the elicitor-induced almond Lox (LOX; Q9LEA9), and tobacco Lox (LOX1; Q43800).

Sequences comparison and phylogenetic analysis

Based on sequence homologies, GhkLox1 shows 45 to 74 % overall homology to previously sequenced plant LOXs (Fig. 2). It displays the highest match with lipoxygenases POTLX-3 of S. tuberosum (74% identity; Kolomiets *et al.*, 2001), LOX1 of N. tabacum (73 % identity; Véronési *et al.*, 1996), LOX1 of A. thaliana (72% identity; Melan *et al.*, 1993). The high overall sequence matches to previously characterized LOXs and the presence of the conserved amino acid motifs and residues essential for enzyme function are evidence for the identity of GhkLox1 as a LOX.

For classification, GhkLox1 amino acid sequence was compared with some previously sequenced plants LOXs. The phylogenetic analysis (Fig. 4) demonstrates that the cotton Ghklox1 is closely related to the pathogen-induced lipoxygenases POTLX-3 gene in potato (Q43191), the Arabidopsis LOX1 gene (Q06327), and the elicitor-induced lipoxygenases in almond (Q9LEA9), and tobacco (LOX1; Q43800).

Expression of LOX during cotton and Xcm interactions

During the incompatible interaction between cotton and Xcm race 18 the HR symptoms began visible on cotyledons 18 and 24 h after infection. Therefore, LOX transcripts accumulation was analysed 10 and 12 h after infection during incompatible and compatible interactions and water infiltration. In the incompatible interaction, high level of LOX mRNA accumulation was detected in cotyledons. In contrast, at the same times no LOX transcripts were detected in compatible and water interactions (Fig. 5). The results shows that GhkLox1 is expressed during the incompatible interaction in response to Xcm race 18 infection.

Discussion

In the present work we reported the cloning of a LOX cDNA (GHKLOX1) from infected cotton Réba B50 by reverse transcriptase-PCR using two degenerate primers derived from consensus sequences found in several plant LOXs. To our knowledge GhkLox1 is the first full-length LOX cDNA cloned from cotton undergoing HR. The putative protein (GhkLox1) displays structural organization and all highly conserved regions similar to that of plant and mammalian LOXs. GhkLox1 shows two LOXs iron-binding region signatures HQLISHWLNTHAAME (residues 521 - 535) and VHPIYKLLYPH (residues 548 - 558) that have been postulated to be important for enzyme activity of both plant and mammalian LOXs

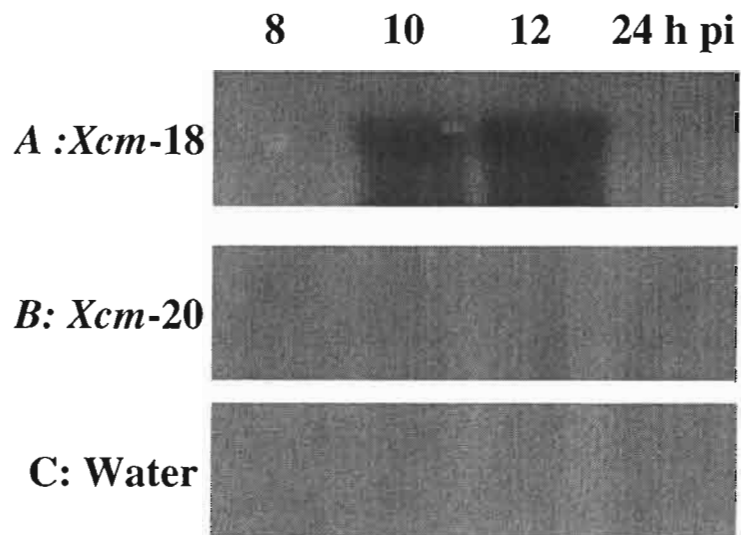


FIGURE 5 : Time course of *GhkLox1* gene expression during interactions with *Xcm* and the water control. Cotton cotyledons were harvested 8, 10, 12 and 24 h after inoculation with *Xcm* and water control. Northern blot analysis was performed with 20 μ g of total RNA and probed with *GhkLox1*. Panel A. Northern blot analysis of LOX transcripts accumulating in *Xcm* race 18-treated cotyledons. Panel B and C. Northern blot analysis of LOX transcripts accumulating in *Xcm*-race 20 and water-treated cotyledons. *GhkLox1* was not expressed during these two interactions at the times studied.

(Boyington *et al.*, 1993). GhkLox1 is closely related to most of the pathogen-induced LOX.

Preliminary investigation of GhkLox1 expression by Northern-blot analysis showed that GhkLox1 transcripts were detected in the Xcm-infected cotyledons only during the incompatible interaction 10 to 12 h after infection. This result suggests that GhkLox1 could be implicated in cotton resistance against Xcm. Time-course of GhkLox1 expression and physiological study of GhkLox1 regulation are currently under process in order to demonstrate LOX involvement in the infection response during the incompatible and compatible interactions between cotton and Xcm.

CHAPITRE 2

Les voies de signalisation impliquées dans l'activation de la lipoxigénase au cours de la réaction hypersensible du cotonnier à *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*

Jalloul, A., Audran, M., Montillet, J.L., Delannoy, E., Agnel, J.P., Daniel, J.F., Assigbetsé, K., Clériver, A., Marmey, P., Geiger, J.P. et Nicole, M.

Article préparé aux normes de Plant Journal pour être soumis à cette revue

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la peroxydation des lipides est associée à l'augmentation de l'activité 9S-LOX et à la transcription de gène GhkLOX1. Dans ce chapitre, notre objectif était d'étudier l'effet de certaines voies de signalisation sur l'activation de la 9S-LOX et de l'induction de la mort cellulaire.

Martinez *et al.* (2000) ont montré que dans les cotylédons infectés par la bactérie avirulente, l'AS s'accumule 6 heures post-inoculation. Ce phénomène était suffisamment précoce pour nous permettre d'envisager son intervention comme signal qui conduit à l'activation des LOXs. De plus, un des produits issus de la décomposition enzymatique du 13-HPOTE : le JA et son dérivé méthylé, le MeJA, sont souvent considérés comme messagers secondaires dans de nombreux mécanismes de défense, incluant de ces enzymes.

Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de ces molécules, AS et MeJA, sur l'activation des LOXs. Les résultats obtenus ont montré que les deux hormones sont capables d'activer les 9S-LOX et la transcription de GhKLOX1. Puis nous avons recherché si le JA est produit chez le cotonnier au cours des interactions incompatible et compatible, pour positionner cet événement sur une échelle de temps par rapport à ceux déjà connus (voir Figure 20, Introduction Générale).

Adaptation of higher plants to environmental changes sometimes involved drastic cell alteration often accompanied by lipid peroxidation, the derived-metabolites of which are collectively called oxylipins (oxidised fatty acid derivatives) (Greschkin, 1998). Oxylipins play diverse roles in plant biology as signal molecules for defence gene expression or as antimicrobial compounds (Hamberg and Gardner, 1992 ; Farmer, 1994). Many of them are generated by the controlled action of lipoxygenases (LOX), which are nonheme iron containing-enzymes. In plants, these enzymes catalyze the regio- and stereo-specific dioxygenation of polyunsaturated fatty acids containing a cis,cis-1, 4-pentadiene structure, such as linoleic acid and linolenic acid. The resulting products, fatty acid hydroperoxides, are subject to diverse array of modifications leading to generation of a large number of other oxilipins whose functions have not been determined so far. This oxygenation step is a branch point starting of a cascade of reactions referred to as LOX pathway in which the hydroperoxides produced are substrates for subsequent action of a wide range of enzymes (Grechkin, 1998).

Production of 13-hydroperoxylinolenic acid by LOX has been studied in details, since metabolised by the action of allene oxide synthase to a family of potent biological molecules known to regulate the expression of defense genes (Creelman and Mullet, 1997; Reymond and Farmer, 1998), inhibition of growth, and promotion of senescence (Hamberg and Gardner, 1992; Holbrook *et al.*, 1997). A 13-LOX was shown to be essential for the synthesis of precursors of wound-induced jasmonic acid (JA) in *Arabidopsis* (Bell *et al.*, 1995). Increased susceptibility to insect attack was observed in transgenic potatoes with reduced 13-LOX levels (Royo *et al.*, 1999) and in *Arabidopsis* deficient in the LOX substrate linolenic acid (McConn *et al.*, 1997). In tobacco plants (Rustérucchi *et al.* 1999) and potato cell cultures (Göbel *et al.*, 2001), 9-LOX was demonstrated to be important in the elicitor-induced hypersensitive response (HR), a form of programmed cell death localized at infection sites (Heath, 2000). Accordingly, products of the 9S-LOX pathway were shown to be closely associated with elicitor-induced hypersensitive cell death in tobacco (Rustérucchi *et al.*, 1999) and *Xanthomonas*-induced HR in cotton (Jalloul *et al.* 2002). Multiple LOX isozymes were shown to be involved in wound- and pathogen-triggered defense responses. In potato, several cDNA that encoded distinct LOX isoforms were identified and their expression shown to be organ-specific and differentially regulated in response to wounding, pathogen infection, and methyl-jasmonate (MeJA) treatment (Royo *et al.*, 1996; Fidantsef *et al.*, 1999). LOX isoforms were also

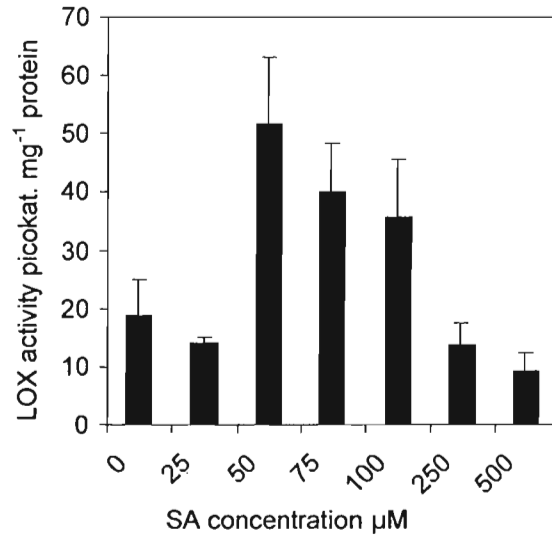
shown to be induced differentially during wheat HR evoked by rust, its specific glycopeptide elicitor, and MeJA (Bohland *et al.*, 1997).

Salicylic acid (SA) (Görlach *et al.*, 1996; Schenk *et al.*, 2000; Weichert *et al.*, 1999), MeJA (Avdiushko *et al.*, 1993, 1995; Saravitz and Siedow, 1996; Weichert *et al.*, 1999; Rustérucci *et al.*, 1999; Véronési *et al.*, 1996), and H₂O₂ (Maccarrone *et al.*, 2000) were demonstrated to be signalling molecules of plant LOX, current observations point out the complexity of LOX regulation during specific resistance. SA was found (1) to inhibit JA synthesis in tomato leaves and to regulate the key reaction of oxylipin formation catalyzed by LOXs (Doares *et al.*, 1995) and (2) to induce allene oxide synthase in *Arabidopsis* (Laudert and Weiler, 1998). Specific LOX genes in barley (Weichert *et al.*, 1999) and *Arabidopsis* leaves were transcriptionally activated by both SA and JA (Schenk *et al.*, 2000), suggesting coordination of LOX expression during plant defense among both signalling pathways.

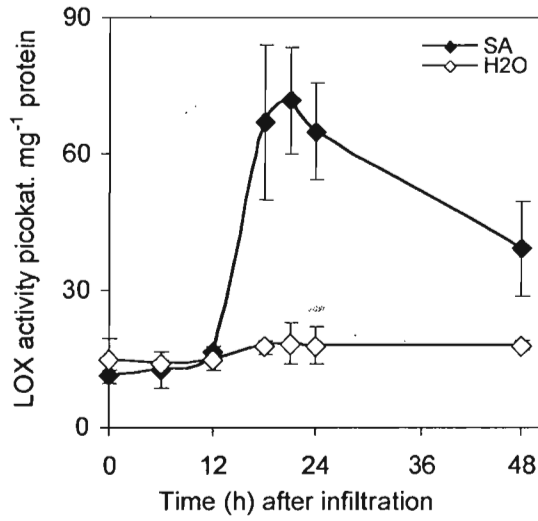
In cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.), HR induced by *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum* (*Xcm*) was characterized by local production of SA, six hours post-infection at HR sites (Martinez *et al.*, 2000), after the oxidative burst (Martinez *et al.*, 1998). Recently, we reported that cotton HR cell death was strongly associated with LOX-dependent lipid peroxidation and a weak autoxidation process (Jalloul *et al.*, 2002). A transient expression of LOX genes correlated with two peaks of 9S-LOX activity, 9 and 24 hours following *Xcm* inoculation. The first peak coincided with activation of pI 4.6 and 7.4 isoforms, while the second peak was associated with activation of pI 4.6 isoform only, production of lipid hydroperoxydes, water loss of infected tissues and apparition of HR symptoms (Jalloul *et al.* 2002).

To further clarify signalling of LOX expression during hypersensitive cell death to *Xcm*, we tested the effects of SA and MeJA on LOX activation in cotton cotyledons. Infiltration with SA or incubation with MeJA both induced LOX gene expression and activity of acidic isoforms. HR-like symptoms were observed when LOX substrates were then injected in cotyledons. Growth of the compatible *Xcm* race 20 dramatically decreased when inoculated to MeJA-treated tissues, but not to SA-injected cotyledons. Investigation of JA according to the time course of cotton HR revealed a sharp and early production two hours post-inoculation of cotyledons, before the oxidative burst and SA accumulation, suggesting that 9S-LOX-dependent HR cell death in *Xcm*-infected cotton is mediated by JA.

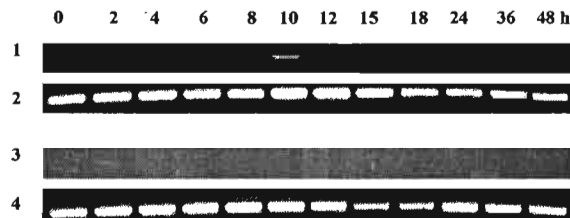
a



b



c



Results

Effect of SA on LOX activation

Concomitant accumulation of SA and expression of LOX gene in *Xcm* race 18-infected cotyledons 6 h post-inoculation led us to explore whether SA triggered LOX expression and activity in cotton plants. A SA dose-dependent experiment revealed a significant effect in increasing LOX activity using low concentration (50-100 μM), whereas higher doses altered this activity (Fig. 1a)¹. The time course of LOX activity stimulated by infiltrated 50 μM SA indicated that the maximum of activity was observed by 18-24 h after injection in cotyledons (Fig. 1b). HPLC analysis was then undertaken to directly estimate the formation of the LOX products, the C18:2 positional 9-HODE and 13-HODE isomers in 50 μM SA-treated tissues. Both isomers were detected, but only 9-HODE was measured in significantly higher amounts in extract of SA-treated cotyledons at 21 h as compared to the same time in control. A specific increase in 9-LOX activity upon SA infiltration was indicated by a corresponding shift ratio of 9- to 13-HODE from 65/35 % in extracts of control cotyledons to 89/11 %, 21 h after infiltration (Table 1). The enantioselectivity ratios *S/R* of the 9-HODE isomers after chiral chromatography analysis revealed that 90 % was the *S* enantiomer for SA-treated cotyledons (21 h post-infiltration) *versus* 80 % at the same time for the control (Table 1). The enantioselectivity ratio *S/R* of the 13-HODE isomers for SA or water treatments was 100 % *S*. IEF comparison of LOX isoform extracted from SA-treated plants revealed three acidic isoforms with an increased activity for the pI 4.6 band (Fig. 3).

¹ **Figure 1.** Dose (a) and time (b, c)-dependent activation of LOX by salicylic acid. The data are representative of five experiments. (a), Reba-B 50 cotyledons were infiltrated with various concentrations of salicylic acid (25-500 μM) and assayed for LOX activity 18 h after infiltration as described above. (b), Reba-B 50 cotyledons were infiltrated with 50 μM salicylic acid for the time indicated on the Figure. Soluble protein was extracted from Reba-B 50 cotyledons as described in the « Experimental procedures » and LOX activity was measured using C18:2 as substrate. (c), cDNA were generated from 50 μM salicylic acid- (lane 1) or water- (lane 3) infiltrated Reba B 50 cotyledons for the time (hours) indicated on the Figure and subjected to PCR using primers that recognize LOX *GhkLox1*, spanning base-pairs 1189-2249. Actin was amplified as an internal control (lane 2 and lane 4) for salicylic acid- and water-infiltrated cotyledons, respectively.

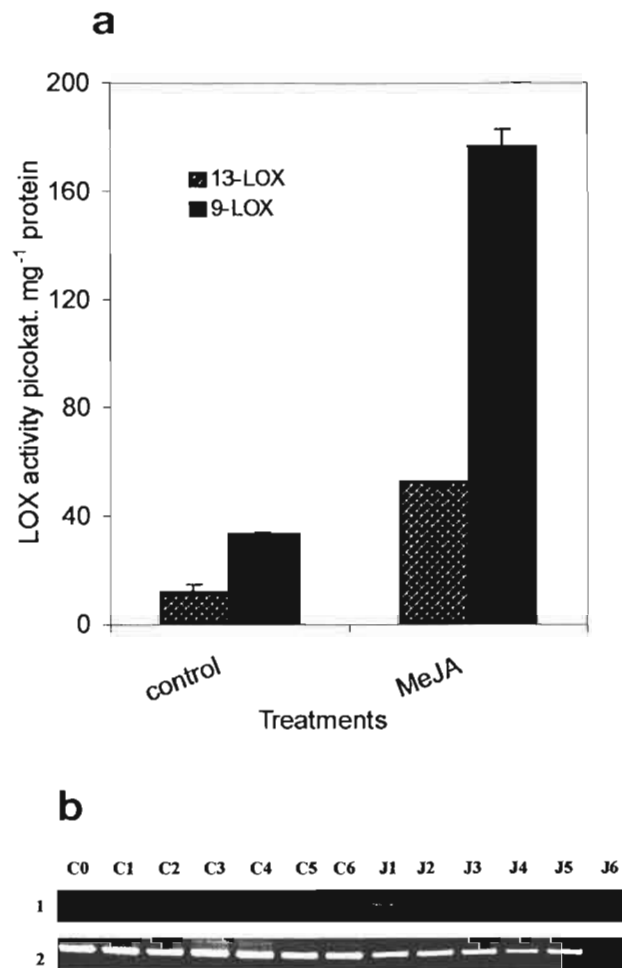


Figure 2: Induction of LOX activity in cotyledon tissues of Reba-B 50 plants in response to exposure of MeJA vapors. (a), change in the abundance of 9-LOX (black columns) and 13-LOX (grey columns) activity in treated and untreated plants. Determination was done from Reba B-50 cotyledons harvested at 5 days of treatment. Means and SD are representative of three experiments. (b), cDNA were generated from cotyledons of control (C0 to C6) or MeJA-treated (J1 to J6) (lane 1) plants for six days and subjected to PCR as described in Figure 1. Actin was amplified as an internal control (lane 2).

Table 1. Enantioselective peroxidation of C18 :2 by LOX extracts. Comparison of SA and MeJA- treated cotyledons.

Treatment (time post treatment)	Regiospecificity (9-HODE/13-HODE) ratio	Enantioselectivity S % \pm SD	
		9-HODE	13-HODE
SA treatment (50 μ M, 21 h)	89/11 \pm 5	90 \pm 1.0	100 \pm 1.0
Water treatment(control, 21 h)	65/35 \pm 1	90 \pm 0.5	100 \pm 1.0
Methyl jasmonate treatment (5 days)	77/23 \pm 1	91 \pm 0.35	89 \pm 3.4
Control for jasmonate (5 days)	74/26 \pm 4	81.5 \pm 0.5	79 \pm 0.78

The regiospecificity and enantioselective transformation of C18 :2 into hydroperoxides were investigated *in vitro* using enzymatic extract by the NaBH₄ hydrolysis extraction procedure. Results are expressed as mean \pm of 3 independent experiments. ND, not determined

Investigation of LOX transcript levels monitored by RT-PCR revealed specific expression of the LOX gene *GhKLox 1* with accumulation between 8 and 15h post-infiltration, and a maximum at 10h (Fig. 1C, lane 1). Expected bands of 1060bp could be amplified with a pair of primers designed from conserved regions of *GhKLox 1*. The identity of the PCR products as fragments amplified from specific *GhKLox 1* transcripts was verified by sequential hybridization from the *GhKLox 1* cDNA probe in accordance with previous data (Jalloul *et al.*, 2002). No signal was detected on RT-PCR in the control plants (Fig. 1c, lane 3).

Effect of MeJA on LOX activation

MeJA and JA are potent inducers of defense responses, including LOX activity (Rustérucci *et al.*, 1999; Avdiushko *et al.*, 1995), with JA being a proposed key component of the octadecanoid-signalling pathway (Farmer and Ryan, 1992). In our study, cotyledons from 10 days-old cotton plants were harvested after 5 days of treatment following application of MeJA vapors. LOX activity increased 5 to 7 fold, with substantial increases for both 13- and 9-LOX as compared to the control (Fig. 2a). An increase of about 53 and 176 picokatal/mg protein of 13- and 9-LOX was recorded in MeJA-treated plants, respectively, while in untreated-plants activity of about 12 and 33 picokatal/mg protein for 13- and 9-LOX was detected, respectively. The specific increase in 9- and in 13-LOX activity was indicated by a corresponding shift ratio of 9- to 13-HODE from 77/23% in extracts of MeJA-treated cotyledons to 74/26% for the control (Table 1).

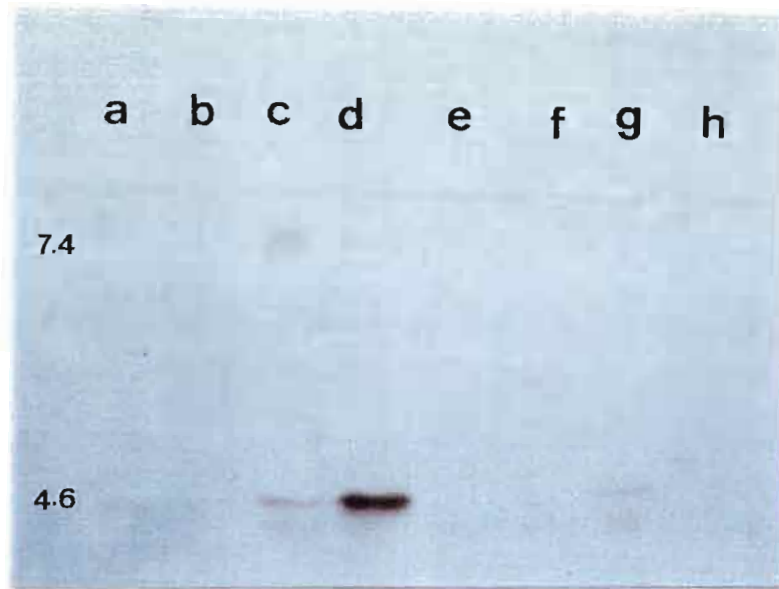


Figure 3 : Analyse IEF des isoformes de LOX

Chiral chromatography analysis revealed that the enantioselectivity ratio *S/R* of 9-HODE isomers was about 91% for MeJA treated cotyledons, and 81.5 % for the control (Table 1). The enantioselectivity ratios *S/R* of the 13-HODE isomers was about 89% for the *S* enantiomer for MeJA treated cotyledons, and 79% for the control.

IEF analysis indicated that LOX from MeJA-treated plants showed three acidic isoforms at pI 4, 4,1 and 4,6, which were activated following the treatment (Fig. 3)².

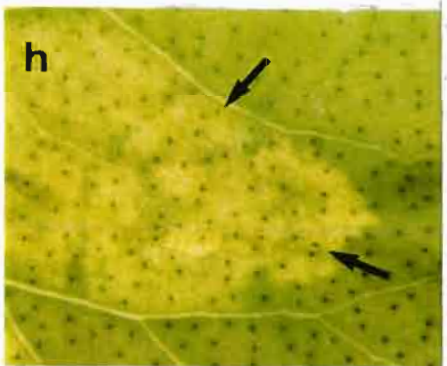
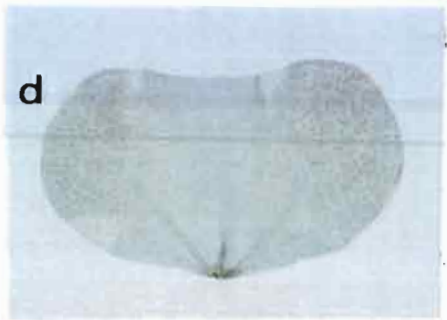
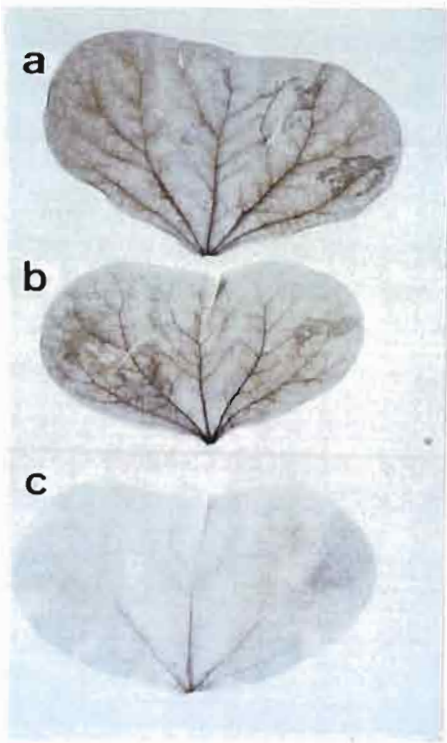
Investigation of LOX transcript levels monitored by RT-PCR revealed specific expression of the cotton LOX gene *GhKLox1* with accumulation between 1 and 5 days of treatment, and a maximum at one day (Fig. 2b, lane 1; J1 to J6). No expression of *GhKLox 1* was detected on RT-PCR in the control plants (Fig. 2b, lane 1; C1 to C6). The identity of the PCR products as fragments amplified from specific *GhKLox 1* transcripts was verified by sequential hybridization from the *GhKLox 1* cDNA probe (data not shown).

Effect of MeJA on H₂O₂ and SA production

Recently, it was mentioned that cotton leaves responded to wound treatment by producing H₂O₂ (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999). In our study, a similar observation was made confirming strong accumulation of H₂O₂ in veins and weak H₂O₂ production in the mesophyll when plants were treated by MeJA for 12 h under dark (Fig. 4a)³. When cotyledons were infected with *Xcm* race 18, H₂O₂ only accumulated in infiltrated areas (4 h post-infection) (Fig. 4b), confirming previous observations (Martinez *et al.*, 1998). Plants without MeJA treatment did not show apparent production of H₂O₂ except in veins (Fig. 4c). Also, when infiltrated with water, no H₂O₂ accumulation was visible (Fig. 4d).

When cotton cotyledons were infiltrated with JA, no SA accumulation following treatment was observed over a period of 12 h (data not shown).

² **Figure 3.** IEF analysis of LOX isoforms. Cotton cotyledons were treated with MeJA or infiltrated with 50 μM SA, water or *Xcm* race 18 and harvested at the time indicated in the legend. Gels (pH 3 -10) were stained for LOX activity using linoleic acid as substrate and θ -dianisidine as staining in mono/di-sodium phosphate buffer, pH 7 (25 μg of total protein per lane). Lanes *a, b*: 50 μM SA-infiltrated cotyledons 24h and 3h post-infiltration ; lanes *c, d*: incompatible interaction (*Xcm* race 18) 9h and 24h post-infection ; lanes *e, f*: water-infiltrated cotyledons 24h and 3h post-infiltration; lanes *g, h* : MeJA treated plants for 5 days and non-treated.



Activation of cell death by LOX substrates in SA- or MeJA-treated cotton cotyledons

Our previous data indicated that following treatment by SA or MeJA, cotton cotyledons contained LOX proteins resulting from gene transcription. Chromatography of hydroxy fatty acids extracted from MeJA-treated or SA-infiltrated cotyledons performed 5 days and 24 h after treatment, respectively, did not revealed differences in accumulation in C18 :2 and C18 :3 positional isomers, as compared to control (data not shown). Similarly, at the concentration used, MeJA- (Fig. 4e) or SA-treated (data not shown) cotyledons did not display any visible HR-like symptoms, as compared to *Xcm* race 18-induced HR (Fig. 4e)⁴.

If we hypothesized that LOX-catalyzed free fatty acids were related to cell death process in cotton (Jalloul *et al.*, 2002), whether induction of necrotic lesions correlated to the presence of hydroperoxy fatty acids was important to determine. To verify this issue, C18 :2 and C18 :3 LOX substrates at 10 mM concentration were each infiltrated into intercellular areas of MeJA-treated or SA-infiltrated cotyledons. In each experiment, HR-like lesions appeared on both types of cotyledons within 45min in C18 :3-infiltrated areas (Fig. 4h), and within 2h in C18 :2-treated tissues (Fig. 4i). 18h following treatment with the LOX substrates, tissues appeared dried (Fig. 4j). When cotyledons were treated with C18 :1 (which is not a LOX substrate) (Fig. 4g), or Tween (Fig. 4f), HR-like symptoms were not observed over a period of 18 h .

⁴ **Figure 4.** Induction of H₂O₂ in cotyledons of Reba B 50 plants in response to MeJA vapors or *Xcm* race 18 infection and macroscopic aspects of HR and HR-like lesions.

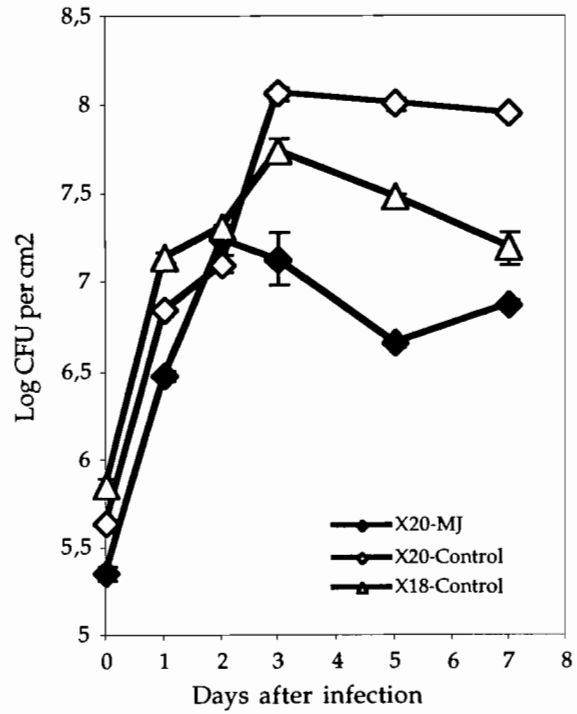
(a - d) Ten-days-old plants were excised at the base of stems, supplied with DAB for 8h, and then (a) exposed to MeJA vapors for 12 h in a closed plastic chamber, or (b) infiltrated with *Xcm* race 18 and examined 4h later, or (c) untreated with MeJA for 12h, or (d) infiltrated with water and examined 4h later. Dark brown colour indicates H₂O₂ accumulation.

(e) In the incompatible interaction, HR symptoms (arrows) on *Xcm* race 18-infected cotyledons 24 hours post-inoculation.

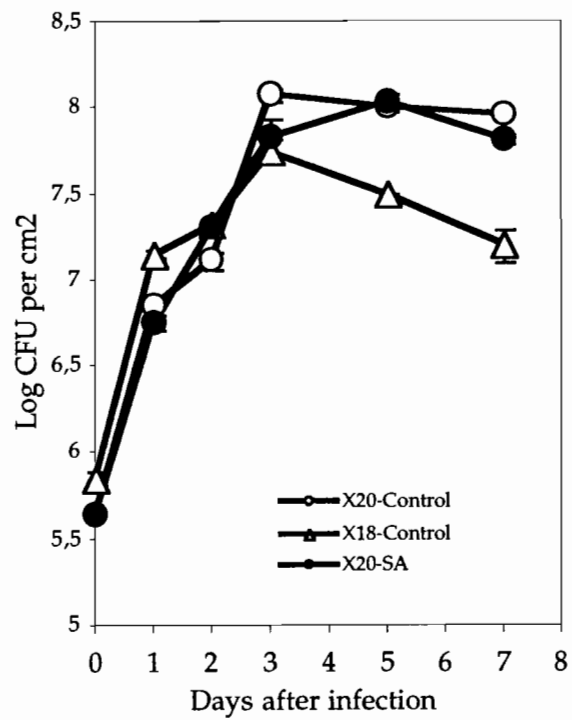
(f - j) Cotyledons from 5-days MeJA-treated plants were infiltrated with 10 mM of various free fatty acids in 0.5 % Tween 80. (f) 0.5 % Tween 80 infiltrated cotyledons 18 h post-infiltration; no HR is visible; (g) C18:1 infiltrated cotyledons 18 h post-infiltration; no HR is visible ; (h) C18:3 infiltrated-cotyledons 45 min post-infiltration showing slight HR symptoms (arrows); (i) C18:2 infiltrated-cotyledons 2 h post-infiltration and (j) C18:3 infiltrated cotyledons 18 h post-infiltration, both showing HR symptoms. (k) cotyledons from 5-days MeJA treated plantes were infected with the virulent *Xcm* race 20. The symptoms presented were those observed 48 h after infection. Typical photographs from triplicate experiments leading to the same results were shown.

Figure 5

a



b



Bacterial growth in MeJA- or SA-treated cotyledons infected with Xcm race 18 or race 20

To assess whether MeJA or SA is required for cotton resistance to *Xcm*, MeJA-pretreated or SA-infiltrated Réba B50 cotyledons were inoculated with the compatible *Xcm* race 20. The number of viable bacteria was then determined during 7 days after inoculation (Fig. 5). By 3 days post-infection of MeJA-treated cotyledons with *Xcm* race 20 (Fig 5a), the bacterial population was found to be 10 times lower, than in non-treated *Xcm* race 20-infiltrated cotyledons, and 5 times lower than in cotyledons infected with *Xcm* race 18. In these experiments, 48h after *Xcm* race 20 inoculation, cotyledons of MeJA-treated plants shown HR-like symptoms (Fig. 4k), similar to those displayed by non-treated *Xcm* race 18-infected cotyledons (Fig. 4e). Under the retained conditions, SA-treated cotyledons infiltrated with *Xcm* race 20 did not display any HR-like symptoms (data not shown), nor reduction of bacterial growth (Fig 5b)⁵.

Accumulation of JA during disease and HR or following SA infiltration

Our results demonstrated the stimulation of 9S- and 13S- LOX activity by MeJA in cotton cotyledons. So far, production of JA during interaction in cotyledon tissues with the pathogen was investigated using GC and mass spectrometry, in order to position this event in the time sequence of events previously determined during cotton HR (Martinez *et al.* 1998, 2000). A dramatic increase in JA content was observed reaching a maximum concentration 2 h post-inoculation of *Xcm* race 18, then decreasing to background levels 6 h after inoculation (Fig. 6). In the opposite, no significant JA accumulation was detected in cotyledons infiltrated with *Xcm* race 20 (compatible interaction), 50 μ M SA or water.

⁵ **Figure 5.** Growth of the virulent *Xcm* race 20 in cotyledons from (a) MeJA- treated (closed symbols) or untreated (open symbols) plants; as control, growth of the avirulent *Xcm* race 18 in untreated plants (open triangles); (b) plants co-infiltrated with 50 μ M salicylic acid and the virulent *Xcm* race 20 (dark circles) ; as control, untreated plants inoculated either with *Xcm* race 20 (open circles) or the avirulent *Xcm* race 18 (open triangles). Means and SD are representative of three replicates.

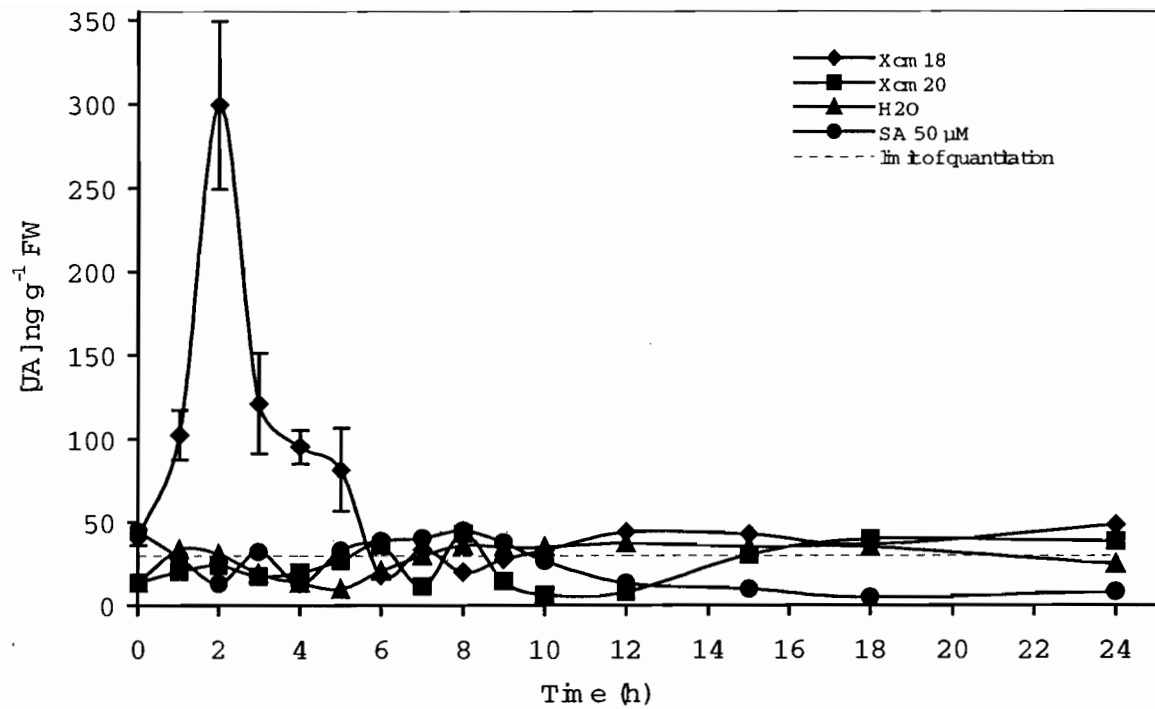


Figure 6: Induction of JA in Reba B 50 cotyledons by infection with the avirulent *Xcm* race 18 or the virulent *Xcm* race 20, or by infiltration with water or 50 μM salicylic acid. Means representative of 2 injections.

Discussion

The present study showed that treatment of cotton with MeJA or SA induced LOX activity and expression, but not cell death. Exogenous MeJA induced both 9S- and 13S-LOX activity, which was never reported before for a same plant, although few recent references reported on whole plant responsiveness of LOX activity to MeJA or JA treatments (Avdiushko *et al.*, 1993, 1995; Bohland *et al.*, 1997; Rust erucci *et al.*, 1999; Schenk *et al.*, 2000). Our data also revealed that SA was able to stimulate cotyledon 9S-LOX, only.

With both MeJA or SA treatments, LOX activity was correlated with the phenotype of cell death after infiltration of specific substrates (C18:2, C18:3). MeJA-treated cotton plants followed by infection by the virulent race *Xcm* 20, induced the HR-like phenotype associated with significant reduction of bacterial growth. In the opposite, when cotyledons were infiltrated by SA and *Xcm* 20, no HR-like symptoms were seen. In line with previous works (Thomma *et al.*, 2000), this indicates that treatment of cotton by MeJA may be relied on activation of an endogenous unknown signal molecule involved in generation of elevated levels of resistance in the presence of the virulent pathogen *Xcm* race 20. H₂O₂ could be a potent candidate for such a signal, since accumulating following treatment with commercial MeJA, as already shown by Orosco-Cadernas and Ryan (1999). Interestingly, H₂O₂ induced by JA was shown in tomato plants to be produced by the NADPH-oxidase (Orosco-Cardenas *et al.*, 2001), while H₂O₂ generated in cotton HR resulted from dismutation of superoxide anions produced by an apoplastic peroxidase, the NADPH-oxidase remaining silent (Martinez *et al.*, 1998). This observation raises the question of possible diverse sources for H₂O₂ in cotton HR to *Xcm* with differential function. Our investigation on the production of JA during cotton HR to *Xcm* revealed substantial and time-localized accumulation of JA in infected areas, 2 hours post-infection before the oxidative burst (3 to 6 hours; Martinez *et al.*, 1998) and SA accumulation (6 hours; Martinez *et al.*, 2000). The initial low constitutive 13S-LOX activity in cotton cotyledons (Jalloul *et al.*, 2002) could be effective enough to early activate JA synthesis which will operate during the incompatible cotton/*Xcm* interaction. This strongly indicates the possible participation of JA in the signaling cascade leading to increase in 9S-LOX activity associated with cotton cell death. It

was also mentioned that JA led to the formation of flavonoid and terpenoid phytoalexins (Gundlach *et al.*, 1992), also previously identified in cotton HR to *Xcm* (Dai *et al.*, 1996; Essenberg and Pierce, 1994), suggesting that JA in cotton may be involved in signalling of antimicrobial molecules.

Differential regulation of LOX isoforms during pathogen infection or upon treatment with elicitor were reported in tomato and wheat plants (Fidantsef *et al.*, 1999; Bohland *et al.*, 1997). In cotton cotyledons, IEF of LOX proteins performed following action of volatile MeJA or SA infiltration never revealed the presence of the pI 7.4 band that was detected during the incompatible interaction (Figure 3). MeJA was reported to occur within several isomers with possible differential functions (Holbrock *et al.*, 1997). But commercial MeJA used in our study was a mixture containing approximately 90% *trans*-MeJA and 10% *cis*-MeJA, as shown during analysis by GC-MS. It is thus likely that the pI 7.4 isoform appearing 9h post-*Xcm* infection could be induced by a JA isoform not available commercially, or by another unknown signal. Extraction and quantitation of JA from cotton cotyledons infected by *Xcm* race 18 revealed the presence 65 % of *cis*-jasmonate at 1 and 2 h after inoculation (data unpublished), suggesting that potent signalling activity of JA is believed to reside in the *cis*-isomers (Ryan, 1992; Mueller *et al.*, 1993; Farmer, 1994), although *trans*-isomers also displayed biological activity (Halbrook *et al.*, 1997). The possibility of epimerization *in vivo* of JA isomers renders interpretation of some bioassays complicated, in particular those conducted over a long time period (Mueller *et al.*, 1993).

Analogies between JA synthesis from linolenic acid in plant cells and that of prostaglandins from arachidonic acid in mammalian cells is relevant. These eicosanoid products were shown to play important functional roles in variety of fundamental biological processes such as inflammation, cellular proliferation, and intracellular signalling (Brash, 1999). Schneider *et al.* (2000; 2002) demonstrated that bioactivity of prostaglandins was based upon stereo-configuration resulting from introduction of molecular oxygen in the *S* configuration at C-15. Consequently, prostaglandin isomers were shown to be differentially implicated in induction of caspase-mediated endothelial cell apoptosis (Bishop-Bailey and Hla, 1999), oxidative stress-mediated myofibroblasts apoptosis (Li *et al.*, 2001), and tumor cell apoptosis (Fukushima *et al.*, 1989).

Finally, our investigations revealed that JA produced early during the incompatible interaction could be involved in LOX activation. Whether JA and SA act

synergistically in the activation of cotton LOX gene is presently under investigation using inhibitors of each signalling pathways.

Materials and Methods

Chemicals

The chemicals used were purchased from the following sources : polyunsaturated fatty acids, and SA from Sigma ; BSTFA + 1% TMCS from PERIECE and MeJA (mixture containing approximately 90% *trans*-MeJA and 10% *cis*-MeJA) from TCI (Interchim, Montluçon, France). Jasmonic acid was prepared by alkaline hydrolysis of the methyl ester as described by Farmer *et al.* (1992). 15-HEDE, used as an internal standard for HPLC quantification, was prepared from eicosadienoic acid, according to the previously described procedure of Martini *et al.* (1994), and the chemical structure was assessed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

Bacterial strains and growth determination

Xanthomonas campestris pathovar *malvacearum* (race 18 and 20) was maintained at 30°C on YPGA_{agar} (0.5 % w/v yeast extract, 0.5 % w/v bacteriological peptone and 0.5 % w/v glucose as a carbone source, solidified with 1.5 % w/v agar Difco, Detroit, MI) in distilled water. Bacteria for inoculation were grown in 150 ml of YPG medium in an shaking incubator at 150 rpm/min at 30 °C. After approximately 18 h of growth, cultures were washed twice with sterile water by centrifugation at 10000g for 10 min to remove nutrients and exopolysaccharides, and then the bacterial pellet was resuspended in sterile water and adjusted to 10⁸ U.F.C/ml.

Isolations were performed from inoculated cotyledons tissues at 0, 1, 2, 3, 5, and 7 days post inoculation. Density of bacterial populations were calculated from serial dilutions plate counts (Bayles et Johnson, 1985). Four discs (10 mm diameter) of inoculated tissues were cut from the cotyledon with a brass cork borer ; the discs obtained were diagonally located in two inoculated areas of a cotyledons, sterilized with ethanol70% and grounded up in 5 ml of sterile, deionized water with an ultraturax. The suspension was serially diluted in water and 100 µl of the final dilution was plated and incubated at 30 °C until colony counting.

Plant growth, inoculation and treatments

Cotton plants (*Gossypium hirsutum* cv. Réba B-50 (Allen x stoneville 2B)), similar to the 101-102 B line, contains the B₂B₃ genes for resistance to all races of *Xcm*, including race 18, except race 20 (Hillocks 1992 ; Innes 1983). They were grown in a greenhouse under natural light at 30/25 °C light/dark cycle with relative humidity averaging 80%. These conditions have been shown to favor bacterial development.

The bacterial suspension 10⁸ U.F.C/ml, or sterile water for control, was injected into intercellular areas of 10 days-old cotyledons using a needled syringe. So far, two interactions have been tested, the incompatible Réba B-50/*Xcm* 18 and the compatible Réba-B50/*Xcm* 20.

Treatment with SA (25, 50, 75, 100, 250 and 500 µM) was performed by infiltration as described before (Martinez *et al.*, 2000). For MeJA treatment, 15 plants were enclosed into a plastic chamber (50-litres) for 5 days, and pure MeJA (10 µl) was applied on a filter paper /plastic chamber (Avdiushko *et al.* 1995). For control, untreated plants were kept in similar plastic chamber. Chemicals in a 0.5 % Tween 80 aqueous solution were injected as described by Rustérucci *et al.*, (1999).

In vivo detection of H₂O₂

H₂O₂ was visually detected in the cotyledons of Réba-B50 by using 3,3-diaminobenzidine (DAB) as substrate (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999) with minor modifications. Briefly, plants were excised at the base of stems with a razor blade and supplied through the cut stems with a 1 mg/ml solution of DAB, pH 5,8, for 8 h under dark at 25 °C. Cotyledons of DAB-treated plants were infiltrated by *Xcm* 18 or water. After infiltration, the plants were continually supplied with DAB solutions under dark until the experiments were terminated by immersion of the cotyledons in boiling ethanol (96 %) for 30 min. This treatment decolorized the cotyledons except for the deep brown polymerization product generated by the reaction of DAB with H₂O₂. After cooling, the cotyledons were immersed at room temperature with fresh ethanol (50%) for some hours, and preserved at room temperature in ethanol (50%) and photographed.

Ten DAB-treated plants were exposed to MeJA vapors in a closed plastic chamber (50-litres) containing a filter paper moistened with 10 µl of MeJA, for the times indicated in the figure. Cotyledons were then treated as above.

Extraction and analysis of hydroxy and hydroperoxy fatty acids

Free and esterified hydroxy and hydroperoxy fatty acids (HPODE and HPOTE) were analysed by HPLC as free hydroxy fatty acids (HODE and HOTE), after NaBH_4 reduction and saponification of a lipid extract as described by Rustérucci *et al.* (1999).

Evaluation of specific lipoxygenase activities in cotyledon extracts

Cotton extracts were prepared according to the procedure described by Rustérucci *et al.* (1999) on one gram of frozen cotyledon tissues. The extract (0,5 ml) was incubated for 20 min at 25°C with 1ml of 250 mM sodium phosphate buffer (pH 7) and 5 μl of an ethanolic solution of linoleic acid (100 mM). The LOX reaction was stopped by addition of 70 μl of HClO_4 (12N), and hydroperoxy fatty acids were extracted in 2 ml of hexane. After vigorous shaking, the absorbance at 234 nm of the upper organic phase was measured (spectrophotometer, Uvikon 922 ; Kontron, Marseille, France) against a blank containing hexane. LOX activity was expressed in picokatal mg^{-1} protein using a molar extinction coefficient for conjugated dienes of 25,000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Regiospecificity and enantioselectivity of lipoxygenase activities in cotyledon extracts

Determination of regiospecificity of LOX activity in the same cotyledons extracts was assessed on linoleic acid as substrate by measuring the 13-HODE/9-HODE ratio. The reaction was performed as described above, except that it was stopped by adding 200 μl of 1 N NaOH and 500 μl of 5 % (w/v) NaBH_4 in 0.2 N NaOH. After addition of the internal reference (100 nmol of 15-HEDE), the pH of the mixture was adjusted to 4.5 with few drops of 12 N HClO_4 . HFA were then extracted in 1.5 ml of hexane/diethyl ether 70/30 (v/v) and analyzed by straight phase HPLC. Thirteen and 9 HODE were then collected individually and their enantiomeric composition was analysed after separation of the *S* and *R* enantiomers on a chiral cell column according to Rustérucci *et al.* (1999). The soluble protein content of the extracts was determined according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Vertical IEF of LOX isoforms

Vertical IEF gel electrophoresis, with ampholytes in the range pH 3-10 (Serva Biochemicals, vike), was performed using a BioRad mini protein gel system (70 mm x 80 mm) according to procedure of Robertson *et al.* (1987) modified for cotton plants by Jalloul *et al.*, (2002).

Determination of jasmonic acid

For analysis and quantitation of JA, cotyledons material was harvested, weighted, and immediately frozen in liquid N₂. Frozen cotyledon tissues (2.5 g) were grounded in liquid nitrogen to a fine powder using a mortar and pestle, and immediately homogenized and extracted with 10 ml of methanol for 60 s with a high performance disperse Ultraturax T25 at 24000 rpm. After centrifugation at 5000 g for 10 min at 4°C, the methanolic supernant was removed, and the pellet was reextracted twice with 10 ml each of methanol. The supernants were combined, and passed through a 0.45 µm filter; the filtrate was evaporated at 25°C to dryness by rotary evaporation. The residue was dissolved with 50 ml of 100 mM sodium phosphate (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) buffer (pH 7.8) containing 5 % (w/v) NaCl. The resulting aqueous solution was extracted three times with 25 ml each of n-hexane, acidified to pH 1.4 by addition of HCl 5 N, and further extracted three times with 25 ml each of CHCl₃. Under acidic conditions, JA was partitioned into chloroforme, collected and evaporated at 25°C to dryness by rotary evaporation. The residue was dissolved in 1 ml of methanol and stored at -20°C until GC-MS analysis was performed.

JA extract (500 µl) was taken to dryness under a stream of nitrogen. The residue was dissolved with 50 µl of derivatisation solution (BSTFA + 1%TMC), and derivatized to its corresponding volatile ester (trimethylsilyl jasmonate) at 70°C for 30 min. The derived mixture was then dried under a stream of nitrogen, and the residue dissolved in 50 µl of n-hexane.

The trimethylsilyl ester derivatives from JA were analysed by gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS) (Hewlett-Packard 5989). The gas chromatography (GC) was equipped with an autosampler (HP 7673) and a split/splitless injector. The SGE BP X 5 PUSED Silica Capillary column (25 m x 0.22 mm x 0.25 µm film thickness) was coupled directly to the source with an interface temperature of 300°C and Helium carrier gas inlet pressure of 40 Kpa. The ion source temperature was 250°C and the electron energy 70 eV. The injector was operated in the splitless mode for 30 s at a temperature of 280°C. The injected volume was 3µl. The GC oven was programed at an initial temperature of 100°C, then increased at 10°C/min to 150°C, then 5°C/min to 250°C, 250°C for 10.5 min, column temperature was further increased at 4°C/min to 300°C. Under these conditions, the retention times of the trimethylsilyl jasmonate isomers were as follows : (9E)-*trans*-JA, 14.42 min; (9Z)-*trans*-JA, 14.78 min ; (9Z)-*cis*-

JA, 15.40 min. All isomers of JA were identified by their characteristic spectrum and by their comparison to JA standard.

Quantitation was made by selected Ion Monitoring (SIM). Two ions, m/z 151 and m/z 282 were selected to make sure of the specificity of the detection. The ion m/z 151 was used for quantitation. Amount of endogenous JA was computed by using calibration curves (seven point measurements) for trimethylsilyl-jasmonate derivatives of the standard JA. The nominal limit for quantitative detection of trimethylsilyl jasmonate by GC-MS was 0.5 ng per μl injected. Areas of peak corresponding to these isomers were combined to give a total amount of these isomers. Note that the extraction procedure did not allow us to quantify the methyl ester form of endogenous jasmonates.

SA determination following JA infiltration

Zero, 10, 50, 100 and 200 μM of JA in a 0.1 % ethanol solution were injected to cotyledons as described above. Extraction and quantitation of SA were performed as described by Martinez *et al.*, (2000).

RT-PCR

Total RNA was extracted from water-, SA- and MeJA-treated cotyledons by the guanidium thiocyanate / CsCl method described by Corre *et al.* (1996). In order to determine the point of maximal LOX *GhkLox1* gene expression, a time course experiment in which LOX transcript levels were measured at different times after treatment was conducted and analyzed by RT-PCR as described by Jalloul *et al.*, (2002).

Acknowledgements

We thank B. Marion and G. Bougard for excellent technical assistance in GC-MS, and S. Boulbeau in HPLC. A. Jalloul was supported by a Ph D grant from University of Damascus (Syria) and her work funded by IRD.

Abbreviations

BSTFA 1%TMCS: N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacétamide +1% triméthylchlorosilane ; pi, post-inoculation; LOX, lipoxygenase; IEF, isoelectric focusing; pI, point isoelectric; HPLC, high pressure liquid chromatography; GC-MS, gas chromatography – mass spectrometry; FW, fresh weight; SA, salicylic acid; JA,

jasmonic acid; MeJA, methyl jasmonate; DAB, 3,3 diaminobenzidine; AOS, active oxygen species; O_2^\ominus , superoxide anions; H_2O_2 , hydrogen peroxide; C18:1, oleic acid; C18:2; linoleic acid; C18:3, linolenic acid; 15-HEDE, 15-hydroxy-11,13(Z,E)-eicosadienoic acid; 9-HODE, 9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid; 13-HODE, 13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid; 9-HOTE, 9-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid; 13-HOTE, 13-hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid; 13-HOTE, 13-hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid; HPOTE, hydroperoxy-octadecatrienoic acid; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; bp, base pair.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à un mécanisme essentiel de la désorganisation de la cellule végétale : **la peroxydation des lipides**, généralement considéré comme le résultat d'effets néfastes des ROS et de radicaux libres. Il s'intègre dans un contexte plus général de recherche sur l'étude des mécanismes de la RH en relation avec la résistance des plantes aux parasites. Le modèle d'étude retenu est le couple hôte-parasite cotonnier - *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* dans deux contextes d'interaction, respectivement compatible et incompatible.

Plusieurs raisons nous ont orientés vers ce choix :

- les travaux antérieurs conduits au laboratoire ont révélé une production importante de ROS (Martinez *et al.*, 1998) dont les fonctions durant la RH du cotonnier, autres que celle suggérée d'induire l'accumulation d'AS (Martinez *et al.*, 2000), sont encore inconnues. Un rôle dans la dégradation des lipides membranaires était alors envisagé, sachant que la RH s'accompagne en général d'une fuite d'électrolytes ;

- les lipides sont l'un des constituants essentiels des systèmes membranaires de la cellule et des organites dont le rôle dans la régulation des échanges de solutés entre les compartiments interne et externe est vital pour leur fonctionnement ; toute atteinte à l'intégrité de cette structure entraîne des dysfonctionnements physiologiques fatals conduisant à la mort cellulaire ;

- la structure lipidique comporte des acides gras polyinsaturés dont les doubles liaisons constituent des « sites » privilégiés pour une attaque enzymatique (lipoxygénases), supposant une autre origine de la peroxydation ; l'accroissement d'une activité lipoxygénase est en outre souvent notée dans des tissus subissant un stress biotique ou abiotique.

C'est donc dans ce cadre que nous nous sommes fixés pour objectif de déterminer les mécanismes enzymatiques conduisant à la peroxydation des lipides (identification de l'enzyme et de ses isoformes, spécificité catalytique) en relation avec la RH. Par ailleurs nous avons étudié l'effet de deux hormones importantes

dans le déroulement de la pathogénèse, l'AS et l'AJ, sur la régulation de l'activité de la lipoxygénase au cours des étapes initiales de l'infection.

*La peroxydation des lipides durant la réaction hypersensible du cotonnier à
Xanthomonas dépend d'une activité 9S-lipoxygénase*

Des analyses biochimiques nous ont permis de définir l'origine et de proposer des signaux impliqués dans l'induction de la peroxydation des lipides. Elle est associée à l'accumulation spécifique d'hydroperoxydes lipidiques de type 9 (9S-HPOTE et 9S-HPODE), produits par une activité spécifique 9S-LOX dès 18 h après l'inoculation. On note cependant durant la phase critique de la peroxydation, entre 24 et 48 h, une faible augmentation des taux de 13-HPODE et 13-HPOTE indiquant qu'une proportion mineure des acides gras est peroxydée en C13. Ce processus de peroxydation est étroitement associée à (i) la perte en eau des tissus infectés (révélateur d'une fuite d'électrolytes), (ii) l'apparition de la RH et (iii) l'augmentation de l'activité de l'isoforme acide de LOX de pI 4.6, très probablement responsable de processus.

Chez le cotonnier réagissant contre *Xcm* race 18, un pic étroit et intense d'activité LOX a été observé à 9 heures, en amont de la peroxydation des lipides 9S-LOX dépendante qui intervient vers 24 heures après l'infection. La spécificité enzymatique déterminée sur les extraits correspondants est légèrement différente de celle observée sur des extraits effectués à 24 et 72h ; mais il apparaît que l'activité associée à ce pic n'est reliée ni à la peroxydation des lipides, ni à l'apparition significative de la perte d'eau et ni à des symptômes de la RH. L'analyse IEF des extraits correspondants (9 heures) révèle la présence d'une isoforme spécifique de LOX, caractérisée par un pI de 7,4.

Ainsi, les deux isoformes de LOX de pI 4,6 et 7,4 possèdent probablement une spécificité et des propriétés biochimiques différentes, ce qui laisse sous-entendre qu'elles remplissent des fonctions physiologiques potentiellement différentes. Nous pouvons dès lors suggérer que l'isoforme de pI 7,4 est une 9S-LOX dont le rôle serait de générer soit des molécules antibactériennes, soit un signal spécifique de

l'installation de la RH, puisque cette isoforme n'est pas produite durant la maladie causée par une race compatible (race 20).

Le clonage du gène *GhKLOX1* codant pour une LOX nous a permis d'étudier son expression dans différents contextes (Assigbetsé *et al.*, 2002). Les résultats de l'analyse de la séquence peptidique révèlent la présence des motifs conservés et communs aux LOXs végétales ou animales et, notamment, des régions riches en histidines qui pourraient être essentielles à la fonction et la spécificité des LOX. Nos résultats indiquent aussi que l'activité de cette LOX est vraisemblablement régulée au niveau transcriptionnel. Cependant, au moins deux gènes de LOX seraient induits dans la réponse à la souche avirulente de *Xcm* (un codant l'isoforme neutre et l'autre codant l'isoforme acide). Aucune donnée n'est cependant disponible sur leurs différences d'homologie et de taille qui permettrait de les distinguer au cours de l'analyse moléculaire. L'ensemble de nos résultats met en évidence le rôle crucial de la 9S-LOX dans le processus de peroxydation des lipides et dans l'exécution de la mort cellulaire de type RH chez le cotonnier. Ces données corroborent les résultats rapportés auparavant sur des feuilles de tabac (Montillet *et al.*, 2002 ; Rustérucchi *et al.*, 1999) et sur des suspensions cellulaires de pomme de terre (Göbel *et al.*, 2001).

Dans l'état actuel des connaissances acquises sur notre modèle sur l'implication des LOX dans la peroxydation des lipides, il conviendrait de poursuivre nos travaux,

- en clonant d'autres gènes LOX du cotonnier dans le but de récupérer ceux codant respectivement pour les isoformes de pI 4,6 et 7,4 ; le ou les promoteurs correspondants seraient caractériser. Les propriétés biochimiques des deux isoformes pourraient alors être caractérisées après qu'elles eussent été produites dans un système hétérologue baculovirus/cellules d'insecte ou cellules de bactéries (*E. coli*). Grâce à cet outil, pourront être conduites des études de mutagenèse dirigée réalisées en parallèle sur les gènes codant pour ces deux protéines afin de révéler des zones d'interaction avec le substrat. Deux protéines de LOX aussi similaires et ayant une forte affinité pour les mêmes substrats doivent présenter des motifs communs essentiels à cette spécificité. La fabrication d'anticorps monoclonaux spécifiques pour immunocytolocaliser les protéines dans les tissus en situation de résistance durant la RH sera réalisée.

- puis par des essais de transformation génétique sur plantes hétérologues - *Arabidopsis thaliana* - avec ces clones pour (i) vérifier l'expression de ces LOX lors

d'une interaction incompatible avec *Xanthomonas campestris pv campestris* (ii) vérifier la spécificité tissulaire ou organaire des clones et (iii) conduire une approche anti-sens pour s'assurer que la suppression de l'activité 9S-LOX entraîne la suppression de la RH et ainsi confirmer le rôle prépondérant de cette enzyme dans cette réaction

L'acide jasmonique :

une molécule clé de la réaction hypersensible du cotonnier à Xanthomonas ?

Afin d'étudier les voies de signalisation impliquées dans l'activation de LOX chez le cotonnier, nous avons testé le rôle de l'AS et du MeJA sur cette stimulation. Nos résultats ont montré que le traitement de plants de cotonnier par ces deux hormones induit l'activité et l'expression de *GhkLox 1*, mais pas la mort cellulaire. Le MeJA exogène induit l'activité 9S- et 13S-LOX, ce qui n'avait encore jamais été montré chez d'autres plantes, peu de références récentes rapportent l'activation de 9S-LOX sur des plantes entières en réponse aux traitements par le MeJA (Rustérucci *et al.*, 1999). Nos données révèlent également que l'AS est capable de stimuler uniquement une activité 9S-LOX. Si l'on effectue des traitements soit au MeJA ou soit à l'AS, et que l'on injecte *in planta*, les substrats spécifiques de LOX, les hydroperoxydes lipidiques produits par l'activité LOX participent à la mort des cellules. Ce qui laisse à penser que les LOXs activées dans l'interaction cotonnier/*Xcm* agissent sur les acides gras polyinsaturés libres (AGPI), ce qui nécessite l'action d'une acyle hydrolase (lipase - patatine) pour libérer les AGPI des chaînes acyles insaturées (Rustérucci *et al.*, 1999 ; Montillet, communication personnelle). Il est toutefois possible que les gènes codant des enzymes de type lipases soient inactivés dans les conditions normales, mais exprimés suite à un stress. Les patatines apparaissent donc comme des enzymes particulières qui méritent d'être étudiées dans le système cotonnier / *Xcm*. Des résultats préliminaires, acquis au laboratoire, sur l'expression de l'une des patatines de cotonnier au cours de l'interaction incompatible nous incitent à proposer une caractérisation de ces enzymes pour vérifier l'origine *in planta* des substrats des 9S-LOX.

Les plantes de cotonnier traitées par le MeJA, puis inoculées avec la souche virulente de *Xcm* (race 20), développent un phénotype RH corrélé à une réduction significative de la population bactérienne. Au contraire, quand les cotylédons sont

infiltrés par l'AS puis par *Xcm* 20, les symptômes RH n'apparaissent pas. Ces résultats indiquent que le traitement par le MeJA pourrait entraîner la production d'une molécule signal endogène inconnue, impliquée dans l'installation de niveaux élevés de résistance en présence du parasite virulent. L' H_2O_2 , candidat potentiel pour un tel signal, s'accumule en effet suite à un traitement avec le MeJA. Il convient de rappeler que la production de H_2O_2 induit par le MeJA chez la tomate résulte d'une activité NADPH-oxidase (Orosco-Cardenas *et al.*, 2001), tandis que chez le cotonnier au cours de la RH cette molécule résulte de la dismutation de l'anion superoxyde produit par une activité peroxydase apoplastique, la NADPH-oxidase restant inactive (Martinez *et al.*, 1998). Cette observation soulève la question de savoir si l' H_2O_2 produit par différentes sources (NADPH-oxidase ou peroxydase) et dans des contextes différents (RH ou traitement au MeJA) peut avoir des fonctions différentes. **Ainsi, l'effet de H_2O_2 sur l'activation de LOX constituerait une piste à explorer.**

L'étude de l'interaction cotonnier/*Xcm* a révélé une accumulation d'AJ très précoce, 2 heures après inoculation dans les tissus inoculés par la bactérie avirulente, avant le burst oxydatif (3 à 6 heures; Martinez *et al.*, 1998) et l'accumulation d'AS (6 heures; Martinez *et al.*, 2000). L'activité 13S-LOX constitutive pourrait être suffisamment efficace pour participer à la néosynthèse d'AJ actif pendant l'interaction incompatible. Nos résultats renforcent l'hypothèse du rôle de l'AJ dans la cascade de signalisation conduisant à l'augmentation de l'activité de 9S-LOX associée à la mort cellulaire de type hypersensible.

L'activation différentielle des isoformes de LOX pendant l'infection par un parasite ou suite à un traitement avec un éliciteur, a été rapportée dans des plantes de blé et de tomate (Fidantsef *et al.*, 1999; Bohland *et al.*, 1997). Chez le cotonnier, les expériences menées au cours de notre travail permettent d'établir clairement, pour l'isoforme neutre de LOX, que ni l'AS ni le MeJA ne participent à son activation. Toutefois, l'intervention de ces molécules dans l'activation des isoformes acides est indéniable. Il a été rapporté que le jasmonate commercial est un mélange de plusieurs isomères aux fonctions différentes (Holbrock *et al.*, 1997). Mais le MeJA commercial employé dans notre étude est un mélange contenant approximativement 90 % de *trans*-JA et 10 % de *cis*-JA. L'extraction et la quantification de l'AJ de cotylédons infectés par *Xcm* 18 ont révélé la présence plus de 65 % de *cis*-JA 1 et 2 h post-infection. De plus, les connaissances acquises sur l'importance du centre chiral

de cette hormone dans certaines études permettent de supposer qu'une activité puissante de signalisation attribuée à l'AJ est liée aux *cis*-isomères (Ryan, 1992; Mueller *et al.*, 1993; Farmer *et al.*, 1994), bien que les *trans*-isomères possèdent aussi une activité biologique (Holbroock *et al.*, 1997). La possibilité de l'épimérisation des isomères d'AJ *in vivo* rend cependant l'interprétation de certains résultats très complexe. Ainsi, le fait que la bande de pI 7.4 de LOX soit induite 9 heures post-infection par *Xcm* race 18, mais pas par le jasmonate commercial, pourrait s'expliquer par la différence de composition entre ce dernier et les formes de jasmonate produites par la plante. Cela n'exclut pas qu'un autre signal puisse être impliqué dans l'activation de l'isoforme neutre de LOX lors de la RH.

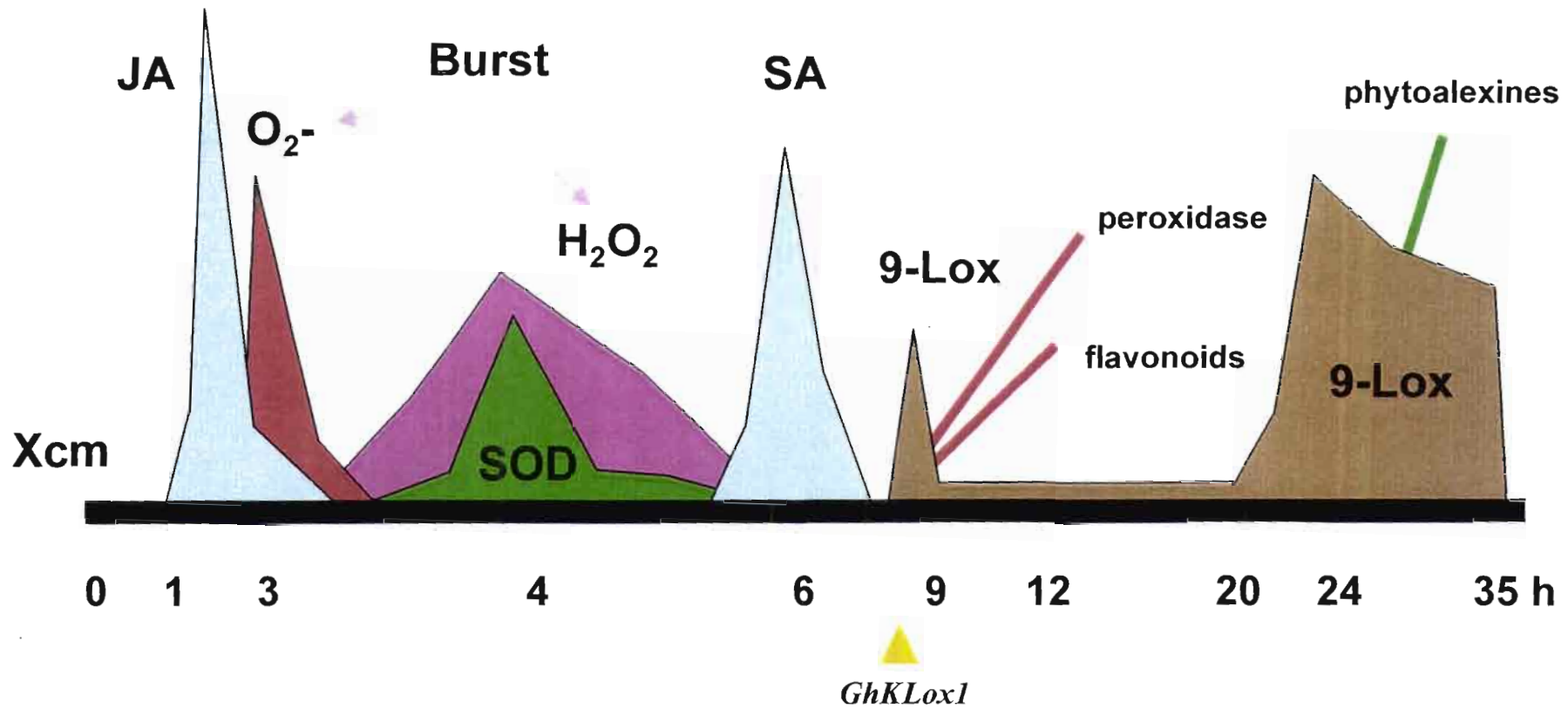
Il existe une analogie entre la synthèse d'AJ à partir de l'acide linoléique chez les plantes et la synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique chez les mammifères. Ces éicosanoïdes jouent des rôles fonctionnels importants dans de nombreux processus biologiques fondamentaux tels que l'inflammation, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la signalisation intracellulaire (Brash, 1999). Schneider *et al.* (2000, 2002) ont démontré que la bioactivité des prostaglandines est associée au centre chiral résultant de l'introduction d'oxygène moléculaire sur le carbone 15 en configuration *S* de l'acide arachidonique. Ainsi, ces isomères contrôlent l'expression de gènes associés à leur production, dont la cyclo-oxygénase. Par analogie, il est possible d'envisager que chez les végétaux, une telle régulation puisse être mise en place en réponse à un agent pathogène.

Il serait donc judicieux dans le prolongement de notre travail, de prendre en compte l'effet de différents isomères de jasmonate sur l'activation des LOX dans des plantes saines et au cours des interactions incompatible et compatible, en utilisant, parallèlement, des inhibiteurs spécifiques de la voie du jasmonate. Ces investigations, bien que très lourdes à mettre en œuvre, permettraient

(i) d'une part, d'apporter des éclaircissements sur le rôle éventuel de l'AJ dans la résistance du cotonnier, *via* son action sur les activités LOX

(ii) et, d'autre part, en raison d'une accumulation aussi précoce de cette hormone (2 heures post-inoculation, à ce jour inédite), d'élucider la fonction précise de l'AJ au cours de la RH aux bactéries en général.

Figure 1 : Schéma récapitulatif des évènements associés à la HR cotonnier à Xcm



En conclusion.....

Les résultats obtenus durant mon travail de thèse permettent de compléter le schéma des évènements de la RH du cotonnier à *Xcm* (figure 1). Par ailleurs, ils m'autorisent à ébaucher un mécanisme de signalisation impliqué dans l'activation des LOX associées à la mort hypersensible (figure 2). A la lumière de cette discussion, et pour avancer dans la compréhension des mécanismes conduisant à la RH dans ce modèle, je propose, en complément de mes résultats, d'explorer les voies de recherches suivantes :

- le rôle du complexe moléculaire « lipoxygénase » durant la RH,
- le rôle des lipases, comme source potentielle des AGPIs,
- les voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces enzymes,
- et le rôle des isomères de l'AJ dans la mort cellulaire hypersensible.

L'acquisition de connaissances précises sur les mécanismes de la résistance du cotonnier devrait favoriser la recherche de nouvelles stratégies de contrôle des maladies, essentiellement axées sur la lutte biologique comme méthode alternative à l'usage de pesticides, non seulement à l'encontre de la bactériose, mais aussi contre d'autres pathologies. L'idée sous-jacente est de stimuler les défenses naturelles du cotonnier pour accroître son aptitude à répondre aux agressions, en utilisant des éliciteurs biotiques de façon à placer le système de défense en situation de préchauffage, permettant à la plante, même dépourvue d'un système de reconnaissance de réagir dès le début de l'agression.

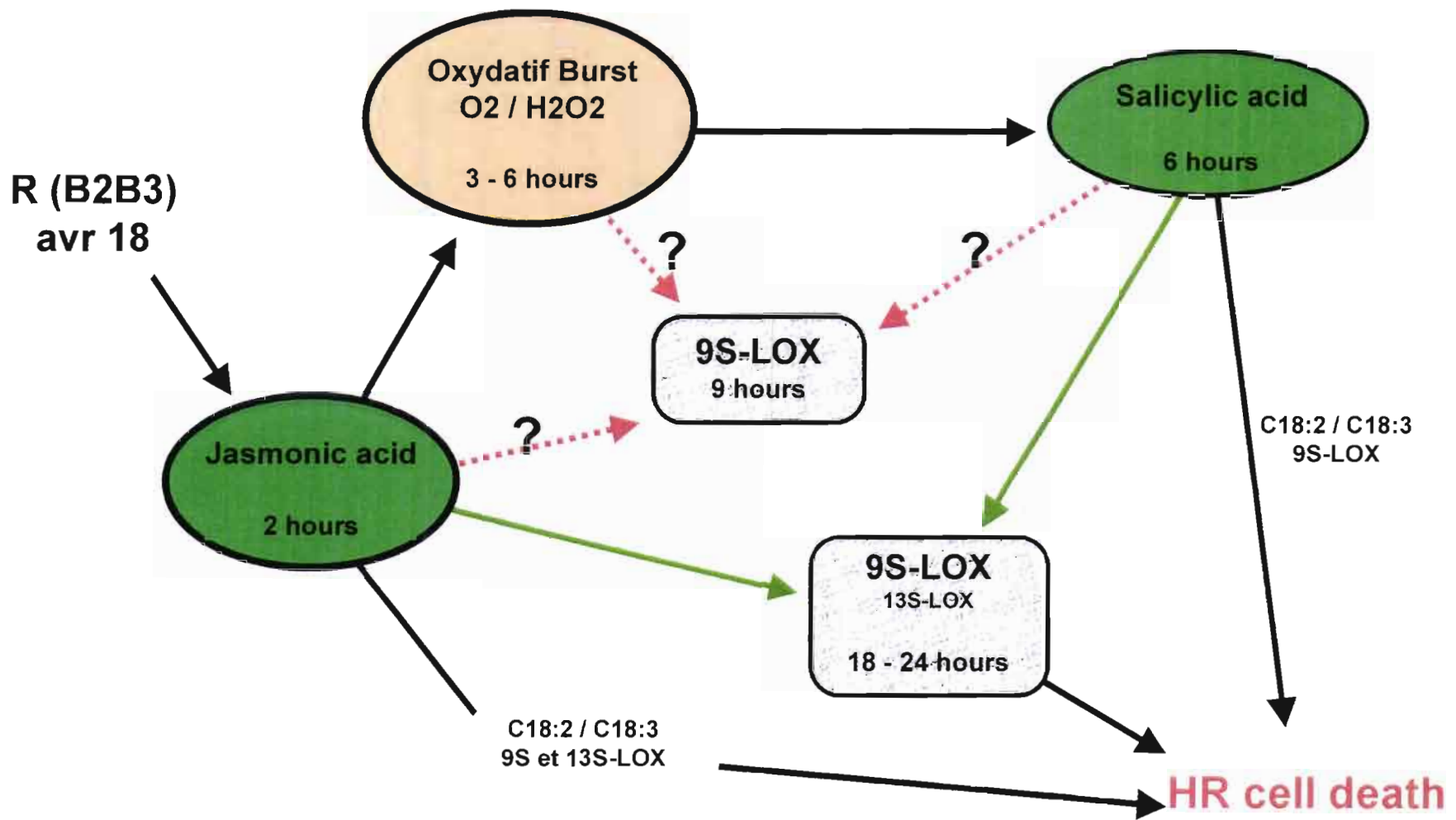


Figure 2 : Schéma hypothétique de l'activation des 9S-LOX chez le cotonnier infecté par Xcm

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, A., Farkas, T., Somlyai, G., Hevesi, M., and Kiraly, Z. (1989) Consequence of O₂⁻ generation during a bacterially induced hypersensitive response in tobacco : deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 13-26.
- Adam, A. L., Pike, S., Hoyos, M. E., Stone, J. M. and Kiraly, Z. (1997) Rapide and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* **115**, 853-861.
- Alami, I., Jouy N. and Clérivet, A. (1999) The lipoxygenase pathway is involved in elicitor-induced phytoalexin accumulation in plane tree (*Platanus acerifolia*) cell-suspension cultures. *J. Phytopathol.* **147**, 515-519.
- Allan, A. C., and Fluhr, R. (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant cell* **9**, 1559-1572.
- Allen, R. D. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107**, 1049-1054.
- AL-Mousawi, A. H., Richardson, P. E., Essenberg, M., and Johnson, W. M. (1982) Specificity of the envelopment of bacteria and other particles in cotton cotyledons. *Phytopathology* **73**, 484-489.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P., Ishikawa, A., Dixon, R. A., and Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**, 773-784.
- Ameisen, J. C. (1999) La sculpture du vivant. *eds Seuil.* pp 338.
- Anderson, P. A., Lawrence, G. J., Morrish, B. C., Ayliffe, M. A., Finnegan, E. J., and Ellis, J. G. (1997) Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* **9**, 641-651.
- Arlat, M., Gijsegem, F. V., Huet, J. C., Pernollet, J. C., and Boucher, C. A. (1994) PopA, a protein which induces a hypersensitive-like response on specific petunia genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J.* **13**, 543-553.
- Arnold, M. H., and Brown, S. J. (1968) Variation in the host-parasite relationship of a crop disease. *J. Agric. Sci.* **71**, 19-36.
- Asada, K. (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In Foyer C. H. and Mullineaux P. M. (eds), Causes of photooxidation stress and amelioration of defence systems in plants. *CRC Press, Boca Raton*, 77-104.
- Assigbetsé, K., Cuny, G., Valette, V., Delannoy, E., Bresson, E., Jalloul, A., Daniel, J. F., Geiger, J. P., and Nicole, M. (1999). Cloning and characterization of a bacterial-induced Peroxidase encoding cDNA from cotton (GenBank accession No. AF155124). *Plant Physiol.* **121**, 312.
- Assigbetsé, K., Jalloul, A., Delannoy, E., Daniel, J. F., Marmey P., Geiger, J. P., and Nicole, M. (2002) Cloning and characterization of a bacterial-induced lipoxygenase encoding cDNA from cotton. *DNA sequence*, in press.
- Atkinson, G. F. (1891) The black rust of cotton. *Alabama Agric. Exp. Stat. Bul.* **27**, 1-16.
- Avdishko, S. A., Ye, X. S., Hildebrand, D., and Kuc, J. (1993) Induction of lipoxygenase activity in immunized cucumber plants. *Physio. Mol. Plant Pathol.* **42**, 83-95.

- Avdiushko, S. A., Croft, K. P. C., Brown, G. C., Jackson, D. M., Hamilton-Kemp, T. R., and Hildebrand, D. (1995) Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and arabidopsis. *Plant Physiol.* **109**, 1227-1230.
- Bachem, C. W., van der Hoeven, R. S., de Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., and Visser, R. G. (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* **9**, 745-753.
- Baillieul, F., Genetet, I., Kopp, M., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffmann, S. (1995) A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco : a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *Plant J.* **8**, 551-560
- Baker, C. J., and Orlandi, E. W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**, 299-321.
- Baker, C. J., Orlandi, E. W. and Mock, N. M. (1993) Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* **102**, 1341-1344.
- Bauer, D. W., Wei, Z. M., Beer, S. V., and Collmer, A. (1995) *Erwinia chrysanthemi* Harpin_{Ech}: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 484-491.
- Baureithel, K., Felix, G., and Boller, T. (1994) Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a nod factor of *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* **269**, 17931-17938.
- Bayles, M. B., and Johnson, W. M. (1985) Growth of homologous and heterologous phytopathogenic bacteria in cotton lines susceptible, resistance, or immune to blight. *Phytopathology* **75**, 515-519.
- Beffa, R., Szell, M., Meuwly, P., Pay, A., Vögeli-Lange, R., Métraux, J. P., Neuhaus, G., Meins, F., and Nagy, F. (1995) Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J.* **14**, 5753-5761.
- Beligni, M. V., and Lamattina, L. (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* **208**, 337-344.
- Bell, E., Creelman, R. A., and Mullet, J. E. (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8675-8679.
- Benhamou, N. (1996) Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* **1**, 233-240.
- Bent, A. F. (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**, 1757-1771.
- Bent, A. F., Innes, R. W., Ecker, J. R. and Staskawicz, B. J. (1992) Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 372-378.
- Bergey, D. R., and Ryan, C. A. (1999) Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.* **40**, 815-823.

- Bhagwat, V. Y., and Bhide, V. P.** (1962) Vascular infection of some cottons by *Xanthomonas malvacearum*. *Ind. Cot. Grow. Rev.* **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. *Plant J.* **8**, 235-245.
- Bishop-Bailey, D., and Hla, T.** (1999) Endothelial cell apoptosis induced by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. *J. Biol. Chem.* **274**, 17042-17048.
- Bisseling, T.** (1999) The role of plant peptides in intercellular signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 365-368.
- Blatt, M. R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K. and Jones, J. D.** (1999) K⁺ channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J.* **19**, 453-462.
- Blée, E. and Joyard, J.** (1996) Enveloppe membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acids hydroperoxides. *Plant Physiol.* **110**, 445-454.
- Blein, J. P., Milat, M. L. and Ricci, P.** (1991) responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol.* **95**, 486-491.
- Blumwald, E., Aharon, G. S., and Lam, B. C. H.** (1998) Early signal transduction pathways in the plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **3**, 342-346.
- Bogdanove, A. J., and Martin, G. B.** (2000) AvrPto-dependent Pto-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8836-8840.
- Boher, B., Brown, I., Nicole, M., Kpemoua, K., Bonas, U., Geiger, J. P., and Mansfield, J.** (1996) Histology and cytochemistry of interactions between plants and *Xanthomonas*. In: *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions*. Nicole N. and Gianinazi-Pearson V. eds. Dordrecht : Kluwer Academic publishers, 193-210.
- Bolhand, C. Balkenhohl, T., Loers, G., Feussner, I. and Grambow, H.** (1997) Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides chitosan, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* **114**, 679-685.
- Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.
- Bolwell, G. P., Butt, V. S., Davies, D. R., and Zimmerlin, A.** (1995) The origin of oxidative burst in plants. *Free Radic. Res.* **23**, 517-532.
- Bolwell, G. P., and Wojtaszek, P.** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence-a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **51**, 347-366.
- Bolwell, G. P., Davies, D. R., Gerrish, C., Auh, C.-K. and Murphy, T. M.** (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* **116**, 1379-1385.
- Bolwell, G. P.** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Cur. Opin. Plant Biol.* **2**, 287-294.
- Bonnet, P. Lacourt, I., Venard, P. and Ricci, P.** (1994) Diversity in pathogenicity to tobacco

- and elicitor production among isolates of *Phytophthora parasitica*. *J. Phytopathol.* **141**, 25-37.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J. P. and Ricci, P.** (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**, 181-192.
- Bostock, R. M., Kuc, J. A., and Laine, R. A.** (1981) Eicosapentenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungi toxic sesquiterpenes in potato. *Science* **212**, 67-69.
- Bostock, R. M., Yamamoto, H., Choi, D., Ricker, K. E., and Ward, B. L.** (1992) Rapid stimulation of 5-lipoxygenase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic acid. *Plant Physiol.* **100**, 1448-1456.
- Bostock, R. M.** (1999) Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 99-109.
- Bottin, A., Véronési, C., Pontier, D., Esquerré-Tugayé, M. T., Blein, J. P., Rusterucci, C. and Ricci, P.** (1994) Differential responses of tobacco cells to elicitors from two *Phytophthora* species. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 373-378.
- Boweler, C., and Fluhr, R.** (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* **5**, 241-246.
- Boyington, J. C., Gaffney, B. J., and Amzel, M. L.** (1993) The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* **260**, 1482-1486.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brash, A.** (1999) Lipoxygenases : occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **274**, 23679-23682.
- 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.
- Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B. and Legrand, M.** (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J.* **14**, 225-234.
- Bryan, G. T., Jia, Y., Farrall, L., Wu, K. S., Hershey, H. P., McAdams, A. S., Faulk, K. N., Donaldson, G. K., Tarchini, R. and Valent, B.** (1999) Molecular characterisation of resistance gene/avirulence gene interaction in the rice blast system. *9th International congress on Molecular Plant-Microbe interactions, Amsterdam, The Netherlands, International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions St. Paul, Minnesota, USA.*
- Buhot, N., Douliez, J. P., Jacquemard, A., Marion, D., Tran, V., Maume, B. F., Milat, L., Ponchet, M., Mikeas, V., Kader, J. C., and Blein, J. P.** (2001) A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett.* **509**, 27-30.
- Buonaurio, R., and Servili, M.** (1999) Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **54**, 155-169.
- Burow, G. B., Gardner, H. W., and Keller, N. P.** (2000) A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization. *Plant Mol. Biol.* **42**, 689-701.

- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., and Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.* **275**, 36734-36740.
- Chamnonngpol, S., Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Camp, W. (1996) Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis related expression under high light. *Plant J.* **10**, 491-503.
- Chamnonngpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Camp, W. (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5818-5823.
- Chandra, S., and Low, P. S. (1995). Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4120-4123.
- Chandra, S., Heinsteins, P. F., and Low, P. S. (1996a) Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* **110**, 979-986.
- Chandra, S., Martin, G. B., and Low, P. S. (1996b) The Pto Kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13393-13397.
- Chandra, S., and Low, P. S. (1997) Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of oxidative burst in Aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 28274-28280.
- Chang, C. and Shockey, J. A. (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 352-358.
- Charkowski, A. O., Huang H. C., and Collmer, A. (1997) Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**, 3866-3874.
- Chen, Z., Ricigliano, J. W., and Klessig, K. F. (1993) Purification and characterization of soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9533-9537.
- Chen, Z., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sanchez-Casas, P., et al. (1995). Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4134-4137.
- Cheong, J. J., Birberg, W., Fügedi, P., Pilotti, A., Gargg, P. J., Hong, N., Ogawa, T., and Hahn, M. G. (1991) Structure-activity relationships of oligo-β-glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Cell* **3**, 127-136.
- Chong, J., Baltz, R., Fritig, B., and Saindrenan, P. (1999) An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Lett.* **17**, 204-208.
- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I. C., Lippok, B., Smith, R. K., et al. (2000) The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9323-9328.
- Cohen, Y., Gisi, U., and Mössinger, E. (1993) Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* **83**, 1054-1062.

- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J. R., and Klessig, D. F. (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7143-7147.
- Conrath, U., Domard A., and Kauss, H. (1989) Chitosan-elicited synthesis of callose and coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **8**, 152-155.
- Cornille, P. (1997) Réponse des végétaux aux chocs oxydants : Rôle de la peroxydation lipidique dans la signalisation cellulaire. *Thèse de l'Université de Montpellier II, Montpellier, France.*
- Corre, F., Henry, Y., Rode, A. and Hartmann, C. (1996) *Em* gene expression during somatic embryogenesis in the monocot *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.*, **117**, 139-149.
- Côté, F., and Hahn, M. G. (1994) Oligosaccharins: structure and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* **12**, 655-662.
- Creelman, R. A., Tierney, M. L., and Mullet, J. E. (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4938-4941.
- Creelman, R. A., and Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355-381.
- Croft, K. P. C., Voisey, F., and Slusarenko, A. J. (1990) Mechanisms of hypersensitive cell collapse : correlation with increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **36**, 49-62.
- Crosse, J. E. (1963) Pathogenicity differences in Tanganyika populations on *Xanthomonas malvacearum*. *Emp. Cott. Grow. Rev.* **40**, 125-130.
- Daï, G. H., Nicole, M., Martinez, C., Bresson, E., Daniel, J. F., Andary, C. and Geiger, J. P. (1996) Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Race 18) and cotton. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**, 285-306.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., and Richberg, M. H. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793-1807.
- Davila-Huerta, G., Hamada, H., Davis, G.D., Stipanovic, R. D., Adams, C. and Essenberg, M. (1994) Cadinane-type sesquiterpenes induced in *Gossypium* cotyledons by bacterial inoculation. *Phytochemistry* **39**, 531-536.
- Davis, E. M., Tsuji, J., Davis, G. D., Pierce, M. L., and Essenberg M. (1996) Purification of (+)-delta-cadinene synthase, a sesquiterpene cyclase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Phytochemistry* **41**, 1047-55.
- De Feyter, R., Yang, Y., and Gabriel, D. W. (1992) Gene-for-gene interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 225-237
- Degoussée, N., Triantaphylidès, C., and Montillet, J. L. (1994) Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* **104**, 945-952.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994) A central role of salicylic

- acid in plant disease resistance. *Science* **266**, 1247-1249.
- Delannoy, E., Assigbetsé, K., Jalloul, A., Daniel, J. F., Marmey, P., Geiger, J. P., Martinez, C., Lherminier, J., Fernandez, D. et Nicole, M. (2002) Differential expression of peroxidase genes during the hypersensitive response of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, en préparation.
- Delledonne, M., Xia, Y. J., Dixon, R. A., and Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13454-13459.
- Del Pozo, O., and Lam, E. (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr. Biol.* **8**, 1129-1132.
- Del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P., and Corpas, F. J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 557-580.
- Dempsey, D. A., Shah, J., and Klessig, D. F. (1999) Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends in Cell Biology* **18**, 547-575.
- Desikan, R., Hancock, J. T., Coffey, M. J., and Neill S. J. (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* **382**, 213-217.
- Dhont, S., Geoffroy, P., Stelmach, B. A., Legran, M., and Heitz, T. (2000) Soluble phospholipase A₂ activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J.* **23**, 431-440.
- Dietrich, R. A., Delaney, T. P., Uknes, S. J., Ward, E. R., Ryals, J. A., and Dangl, J. L. (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **7**, 565-577.
- Dietrich, R. A., Richberg, M. H., Schmidt, R., Dean, C., and Dangl, J. L. (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**, 685-694.
- Dinesh-Kumar, S. P., Whitham, S., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1995) Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene N: Its possible role in the TMV-N-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4175-4180.
- Dixon, R. A., Harrison, M. J., and Lamb, C. J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 479-501.
- Dixon, M. S., Golstein, C., Thomas, C. M., van der Biezen, E. A., and Jones, J. D. G. (2000) Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8807-8814.
- Doares, S. H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A., and Ryan, C. A. (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **108**, 1741-1746.
- Doke, N. (1983a) Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant pathol.* **23**, 345-357.

- Doke, N.** (1983b) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts upon the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* **23**, 359-367.
- Doke, N. and Ohashi, Y.** (1988) Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **32**, 163-175.
- Dong, H., Delaney, T. P., Bauer D. W., and Beer, S. V.** (1999) Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and NIM1 gene. *Plant J.* **20**, 207-215.
- Dong, X.** (1995) Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7137-7139.
- Dong, X.** (1998) SA, JA, ethylene and disease resistance in plants. *Cur. Op. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M. A., Saindrenan, P., Fritig, B. and Kauffmann, S.** (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 646-655.
- Dransfield, M.** (1969) Report from Northern States, Nigeria. Empire Cotton Growing Corporation. *Rep. Exp. Stat.* 24-26.
- Draper, J.** (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci.* **2**, 162-165.
- Drew, M. C., He, C. J., and Morgan, P. W.** (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science* **5**, 123-127.
- Du, H., and Klessig, D. F.** (1997) Identification of a soluble, high-affinity salicylic acid binding protein in tobacco. *Plant Physiol.* **113**, 1319-1327.
- Durner, J., and Klessig, D. F.** (1996) Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.* **271**, 28492-28501.
- Durner, J., and Klessig, D. F.** (1999) Nitric oxide as signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 369-374.
- Durner, J., Shah, J., and Klessig, D. F.** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 266-274.
- Durner, J., Wendehenne, D., and Klessig, D. F.** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10328-10333.
- Dwyer, S. C., Legendre, L., Low, P. S., and Leto, T. L.** (1996) Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 231-237.
- Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lellot, R. A., and Schroth, M. N.** (1980) International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* **59**, 153-168.
- Ebel, J., and Mithöfer, A.** (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**, 335-348.

- Ecker, J. R. (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**, 667-675.
- Edgerton, C. W. (1912) The rots of the cotton boll. *Agr. Exp. St. Bul.* **137**, 133p.
- Ellis, C., and Turner, J. G. (2001) The arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**, 1025-1033.
- 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.
- Essenberg, M., Doherty, M., Hamilton, B. K., Heenning, V. T., Cover, E. C., Mcfaul, S. J., and Johnson, W. M. (1982) Identification and effects on *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* of two phytoalexins from leaves and cotyledons of resistant cotton. *Phytopathology* **72**, 1349-1356.
- Essenberg, M., Grover, P. B. Jr, and Cover, E. C. (1990) Accumulation of antibacterial sesquiterpenoids in bacterially inoculated inoculated *Gossypium* leaves and cotyledons. *Phytochemistry* **29**, 3107-3113.
- Essenberg, M., Pierce, M., Cover, E. C., Hamilton, B., Richardson, P. E., and Scholes, V. E. (1992a) A method for determining phytoalexin concentration in fluorescent, hypersensitively necrotic cells in cotton leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **41**, 101-109.
- Essenberg, M., Pierce, M., Hamilton, B. Cover, E. C., Scholes, V. E., and Richardson, P. E. (1992b) Development of fluorescent, hypersensitively necrotic cells containing phytoalexins adjacent to colonies of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **41**, 85-99.
- Essenberg, M., and Pierce, M. (1994) Sesquiterpenoid phytoalexins synthesised in cotton leaves and cotyledons during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. In: *Handbook of phytoalexin metabolism and action*. Daniel M., and Purkayastha R.P. eds. New York, Basel Hong Kong : Marcel Dekker, Inc. 183-198.
- Esterbauer, H., Schur, R. J., and Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81-128.
- Farmer, E. E. (1994) Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1423-1437.
- Farmer, E. E., Johnson, R. R., Ryan, C. A. (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **98**, 995-1002.
- Farmer, E. E., and Ryan, C. A. (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7713-7716.
- Farmer, E. E., and Ryan, C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129-134.
- Faulwetter, R. C. (1917) Wind-blown rain, a factor in disease dissemination. *J. Agric. Res.* **10**, 639-48.
- Felix, G., and Boller, T. (1995) Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *Plant J.* **7**, 381-389.
- Felix, G., Grosskopf, D. G., Regenass, M., and Boller, T. (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8831-8834.

- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., and Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**, 265-276.
- Feussner, I., Hause, B., Nellen, A., Wasternack, C., and Kindl, H. (1996) Lipid body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. *Planta* **198**, 288-293.
- Feussner, I., Balkenhohl, T. J., Porzel, A., Külin, H., and Wasternack, C. (1997) Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. *J. Biol. Chem.* **272**, 21635-21642.
- Feussner, I., Kühn, H., and Wasternack, C. (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* **6**, 268-273.
- Fidantsef, A. L., Stout, M. J., Thaler, J. S., Duffey, S. S., and Bostock, R. M. (1999) Signal interactions in pathogen and insect attack : expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **54**, 9-114.
- Findlay, W. P. K. (1928) Some conditions influencing the development of bacterial disease of cotton (*Bacterium malvacearum*). *Emp. Cot. Grow. Rev.* **5**, 29-39.
- Flor, H. H. (1942) Interitance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**, [Abstract].
- Follin, J.C. (1983) Races of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye in Western and Central Africa. *Cot. Fib. Trop.* **38**, 277-280.
- Follin, J. C., Girardot, B., Mangano, V., and Benitez, R. (1988) Nouveaux resultats sur le déterminisme génétique de la résistance foliaire totale du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) à la bactériose (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye, race 18 et 20. *Cot. Fibres Trop.* **3**, 167-175.
- Foyer, C. H. (1993) La résistance des plantes à l'oxygène. *La Recherche* **24**, 270-276.
- Fritig, B., Heitz, T., and Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 16-22.
- Fukuda, H. (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**, 245-253.
- Fukushima, M., Kato, T., Narumiya, Y., Sasaki, H., Terashima, Y., Nishiyama, Y., and Santoro, M. G. (1989) Prostaglandin A and J: antitumor and antiviral prostaglandins. *Adv. Prostaglandin Thromboxane leukot. Res.* **19**, 415-418.
- Gabriel, D. W., Burges, A., and Lazo, G. R. (1986) Gene for gene interaction of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6415-6419.
- 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.
- Gelli, A., Higgins, V. J., and Blumwald, E. (1997) Activation of plant plasma membrane Ca⁺-permeable channel by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* **113**, 269-279.
- Glazebrook, J. (1999) Genes controlling expression of defense response in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 280-286.

- Glazener, J. A., Orlandi, E. W., and Baker, C. J. (1996) The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.* **110**, 759-763.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., and Rosahl, S. (2001) Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 6267-6273.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999) A single locus determine sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 277-284.
- Goodman, R. N., and Novacky, A. J. (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens. *St. Paul, APS Press* 244 p.
- Gopalan, S., and He, S. Y. (1996) Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. *Plant Dis.* **80**, 604-608.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* **8**, 629-643.
- Gorski, P. M., Vickstrom, T. E., Pierce, M. L., and Essenberg, M. (1995) A C-13-pulse-labeling study of phytoalexin biosynthesis in hypersensitively responding cotton cotyledons. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**, 339-355.
- Granado, J., Felix, G., and Boller, T. (1995) Perception of fungal sterols in plants. *Plant Physiol.* **107**, 485-490.
- Grant, M., and Mansfield, J. (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **2**, 312-319.
- Grant, J. J., and Loake, G. J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* **124**, 21-29.
- Grechkin, A. (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* **37**, 317-352.
- Green, J. N. M., and Brinkerhoff, L. A. (1956) Inheritance of 3 genes for bacterial blight resistance in Upland cotton. *Agro. J.* **48**, 481-5.
- Greenberg, J. T. (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12094-12097.
- Greenberg, J. T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525-545.
- Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F., and Ausubel, F. M. (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**, 551-563.
- Groom, O. J., Torres, M. A., Fordham-Skelton, A. P., Hammond-Kosack, K. E., Robinson, N. J., and Jones, J. D. G. (1996) *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase. *Plant J.* **10**, 515-522.
- Grosskopf, D. G., Felix, G., and Boller, T. (1990) K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors *in vivo* and their microsomal protein kinase *in vitro*. *FEBS Lett.* **275**, 177-180.

- Grosskopf, D. G., Felix, G., and Boller, T. (1991) K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors *in vivo* and their microsomal protein kinase *in vitro*. *FEBS Lett.* **275**, 177-180.
- Gu, Y. Q., Yang, C., Thara, V. K., Zhou, J., Martin, G. B. (2000) *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *The Plant Cell* **12**, 771-785.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., and Zenk, M. H. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2389-2393.
- Guo, A. L., Salih, G., and Klessig, D. F. (2000) Activation of a diverse set of genes during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent. *Plant J.* **21**, 409-418.
- Gupta, V., Willits, M. G., and Glazebrook, J. (2000) *Arabidopsis thaliana* eds4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 503-511.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. R., and Schmelzer, E. (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4150-4157
- Hahn, M. G. (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 387-412.
- Hamberg, M., and Gardner, H. W. (1992) Oxilipin pathway to jasmonate : biochemistry and biological significance. *Biochim. Biophys. Acta* **1165**, 1-18.
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones, D. G. (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 575-607.
- Hansford, G. G. (1932) Blackarm disease of cotton in Uganda. *Emp. Cot. Grow.Rev.* **9**, 21-31.
- Hardie, D. G. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 97-131.
- He, S. Y., Huang, H. C., and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin_{ps}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**, 1255-1266.
- Heath, M. C. (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 117-124.
- Heath, M. C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**, 321-334.
- Heo, W. D., Lee, S. H., Kim, J. C., Chung, W. S., Chun, H. J., Lee, K. J., Park, C. Y., Park, H. C., Choi, J. Y., and Cho, M. J. (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 766-771.
- Hillocks, R. J. (1984) Production of cotton plants resistant to *Fusarium* wilt with special reference to Tanzania. *Trop.Pest Manag.* **30**, 234-246.
- Hillocks, R. J. (1992) Cotton Diseases. CAB International. Melksham : Redwood Press. 415p.
- Hirt, H. (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinases pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2405-2407.

- Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241-251.
- Holbrook, L., Tung, P., Ward, K., Reid, D. M., Abrams, S., Lamb, N., Quail, J. W., and Moloney, M. M. (1997) Importance of the chiral centres of jasmonic acid in the responses of plants. Activities and antagonism between natural and synthetic analogue. *Plant Physiol.* **114**, 419-428.
- Hornung, E., Walther, M., Kühn, H., and Feussner, I. (1999) Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenase species by site directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4192-4197.
- Hunt, M. D., Delaney, T. P., Dietrich, R. A., Weymann, K. B., Dangl, J. L., and Ryals, J. A. (1997) Salicylate independent lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 531-536.
- 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, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Hutcheson, S. W. (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 59-90.
- Innes, N. L. (1966) Inheritance of resistance to bacterial blight of cotton. 3. *Herbaceum* resistance transferred to tetraploid cotton. *Journal of Agricultural Science* **66**, 433-439.
- Innes, N. (1983) Bacterial blight of cotton. *Biol. Rev.* **58**, 157-176.
- Ito, Y., Kaku, H., and Shibuya, N. (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J.* **12**, 347-356.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and $O_2^{\cdot -}$ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4800-4805.
- Jabs, T., Dietrich, R. A., and Dangl, J. F. (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**, 1853-1856.
- Jalloul, A., Montillet, J. L., Assigbetsé, K., Agnel, J. P., Delannoy, E., Triantaphilidès, C., Daniel, J. F., Marmey, P., Geiger, J. P., and Nicole, M. (2002) Lipid peroxidation in cotton-*Xanthomonas* interactions. Role of lipoxygenase during the hypersensitive reaction and leaf blight. *Plant J.*, in press.
- Jin, D. F., and West, C. A. (1984) Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of casbene synthetase activity in castor bean seedlings. *Plant Physiol.* **74**, 989-992.
- Johal, G. S., and Briggs, S. P. (1992) Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science* **258**, 985-987.
- Jones, A. (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.* **5**, 225-229.
- Kamoun, S., vanWest, P., Vleeshouwers, V. G. A. A., Groot, K. E. D., and Govers, F. (1998)

Resistance of *Nicotiana Benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **10**, 1413-1425.

- Kamoun, S., Young, M., Förster, H., Coffey, M. D., and Tyler, B. M.** (1994) Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 1593-1598.
- Kamoun, S., Young, M., Glascock, C. B., and Tyler, B. M.** (1993) Extracellular protein elicitor from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 15-25.
- Kato, T., Ohta, H., Tanaka, K., and Shibata, D.** (1992) Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. *Plant Physiol.* **98**, 324-330.
- Katz, V. A., Thulke, O. U., and Conrath, U.** (1998) A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol.* **117**, 1333-1339.
- Kausch, K. D., and Handa, A. K.** (1997) Molecular cloning of a ripening-specific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. *Plant Physiol.* **113**, 1041-1050.
- Kauss, H., and Jeblick, W.** (1995) Pretreatment of Parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H₂O₂. *Plant Physiol.* **108**, 1171-1178.
- Kauss, H., Theisinger-Hinkel, E., Mindermann, R., and Conrath, U.** (1992) Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant J.* **2**, 655-660.
- Keen, N. T.** (1992) The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol. Biol.* **19**, 109-122.
- Keen, N. T., Sims, J. J., Midland, S., Yoder, M., Jurnak, F., Shen, H., Boyd, C., Yucel, I., Lorang, J., and Murillo, J.** (1993) Determinants of specificity in the interaction of plants with bacterial pathogens. In: Nester EW, Verma DPS (eds) *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, 211-220.
- Keller, H., Blein, J. P., Bonnet, P., and Ricci, P.** (1996a) Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol.* **110**, 365-376.
- Keller, H., Bonnet, P., Galiana, E., Pruvot, L., Friedrich, L., Ryals, J., and Ricci, P.** (1996b) Salicylic acid mediates elicitor-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 696-703.
- Keller, H., Pamboukdjian, N., Ponchet, M., Poupet, A., Delon, R., Verrier, J. L., Roby, D., and Ricci, P.** (1999) Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell* **11**, 223-235.
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R., and Lamb, C.** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**, 255-266.
- Kenton, P., Mur, L. A. J., Atzorn, R., Wasternack, C., and Draper, J.** (1999) (-)-Jasmonic acid accumulation in tobacco hypersensitive response lesions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 74-78.
- Keppeler, L. D., and Novacky, A.** (1986) Involvement of membrane lipid peroxidation in the

- development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathology* **65**, 104-108.
- Keppler, L. D., and Novacky, A.** (1987) The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive response. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **30**, 233-245.
- Keppler, L. D., and Baker, C. J.** (1989) O₂[•]-initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions. *Phytopathology* **79**, 555-562.
- Keppler, L. D., Baker, C. J., and Atkinson, M. M.** (1989) Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology* **79**, 974-978.
- Kieffer, F., Simon-Plas, F., Maume, B. F., and Blein, J. P.** (1997) Tobacco cells contain a protein, immunologically related to the neutrophil small G protein Rac2 and involved in elicitor-induced oxidative burst. *FEBS Lett.* **403**, 149-153.
- Kieffer, F., Lherminier, J., Simon-Plas, F., Nicole, M., Elmayan, T. and Blein, J. P.** (2000) Cell wall modifications induced on tobacco suspension cells by cryptogein. *J. Exp. Botany* **51**, 1799-1811.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, M., Kloareg, B., and Fritig, B.** (2000) Linear β -1,3 Glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* **124**, 1027-1037.
- Klessig, D. F., and Malamy, J.** (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1439-1458.
- Knight, R. L.** (1944) The genetics of blackarm resistance. 4. *Gossypium punctatum* (Sch. and Thom.) crosses. *J. Genet.* **46**, 1-27.
- Knight, R. L.** (1946) Breeding cotton resistant to blackarm disease (*Bacterium malvacearum*). *Emp. J. Exp. Agric.* **14**, 153-74.
- Knight, R. L.** (1948) The genetics of blackarm resistance. 6. Transference of resistance from *Gossypium arboreum* L. to *G. Barbadense*. *J. Genet.* **48**, 359-69.
- Knight, R. L.** (1950) The genetics of blackarm resistance. 8. *Gossypium barbadense*. *J. Genet.* **50**, 67-76.
- Knight, R. L.** (1953a) The genetics of blackarm resistance. 9. The gene B6m from *Gossypium arboreum*. *J. Genet.* **51**, 270-5.
- Knight, R. L.** (1953b) The genetics of blackarm resistance. 10. The gene B7 from Stoneville 20. *J. Genet.* **51**, 515-19.
- Knight, R. L.** (1954a) Cotton breeding in the Sudan. Part 1. Egyptian cotton. *Emp. J. Exp. Agric.* **22**, 68-80.
- Knight, R. L.** (1954b) Cotton breeding in the Sudan. Part 3. American Upland cotton. *Emp. J. Exp. Agric.* **22**, 176-84.
- Knight, R. L.** (1963) The genetics of blackarm resistance. 12. Transference of resistance from *G.ossypium herbaceum* to *G.ossypium barbadense*. *J. Genet.* **58**, 324-46.
- Knight, R. L., and Clouston, T. W.** (1939) The genetics of blackarm resistance. 1. Factors B2 and B3. *J. Genet.* **38**, 133-59.
- Knight, H., Trewavas, A. J., and Knight, M. R.** (1996) Cold calcium signaling in arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant*

Cell **8**, 489-503.

- Knoester, M., Van Loon, L. C., Van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J. F., and Linthorst, H. J. M.** (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1933-1937.
- Kolomiets, M. V., Chen, H., Gladon, R. J., Braun, E. J., and Hannapel, D. J.** (2000) A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol.* **124**, 1121-1130.
- Kolomiets, M. V., Hannapel, D. J., Chen, H., Tymeson, M. and Gladon, R. J.** (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* **13**, 613-626.
- Kosslak, R. M., Chamberlin, M. A., Plamer, R. G., and Bowen, B. A.** (1997) Programmed cell death in the root cortex of soybean necrosis mutants. *Plant J.* **11**, 729-745.
- Kvaratskhelia, M., George, S. J., and Thorneley, R. N. F.** (1997) Salicylic acid a reducing substrate and not an effective inhibitor of ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* **272**, 20998-21001.
- Lahaye, T. and Bonas, U.** (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.* **6**, 479-485.
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., and Dixon, R. A.** (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**, 215-224.
- Lamb, C., and Dixon, R. A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Laudert, D., and Weiler, E. W.** (1998) Allene oxide synthase : a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* **15**, 675-684.
- Lawton, K. A., Potter, S. L., Uknes, S., and Ryals, J.** (1994) Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* **6**, 581-588.
- Leach, J. E., and White, F. F.** (1996) Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. of Phytopathol.* **34**, 153-179.
- Lee, H. I., Leon, J., and Raskin, I.** (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4076-4079.
- Legendre, L., Yueh, Y. G., Crain, R., Haddock, N., Heinstein, P. F., and Low, P. S.** (1993) Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 24559-24563.
- Léon, J., and Sanchez-Serrano, J. J.** (1999) Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 373-380.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C.** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.
- Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., Palmer, R., and Lamb, C.** (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* **6**, 427-437.
- Leyendecker, P. J.** (1950) Plant disease survey for New Mexico. *Plant Dis. Rep.* **34**, 39-44.
- Ligterink, W.** (2000) MAP kinases in plant signal transduction: how many, and what for? *Res. Prob. Cell Diff.* **27**, 11-27.

- Li, L., Tao, J., Davaille, J., Féral, C., Mallat, A., Rieusset, J., Vidal, H., and Lotersztajn, S. (2001) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ induce apoptosis of human hepatic myofibroblasts. A pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 38152-38158.
- Li, W. X., Kodama, O., and Akatsuka, T. (1991) Role of oxygenated fatty acids in rice phytoalexin production. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1041-1047.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J. D., Li, Y., and Dong, X. (1999) Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* **98**, 329-339.
- Logan, C. (1960) An estimate of the effect of seed treatment in reducing cotton crop losses caused by *Xanthomonas malvacearum* (E. F. Smith) Dow. in Uganda. *Emp. Cot. Grow. Rev.* **37**, 241-255.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987) Improved method for isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16-20.
- Loughrin, J. H., Manukian, A., Heath, R. R., and Turlings, T. C. J. (1994) Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11836-11840.
- Low, P. S., and Merida, J. R. (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiolgia Plantarum* **96**, 533-542.
- Lund, S. T., Stall, R. E., and Klee, H. J. (1998) Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**, 371-382.
- Maccarrone, M., van Zadelhoff, G., Veldick, G. A., Vliegenhart, J. F. G., and Finazzi-Agro, A. (2000) Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5078-5084.
- Malamy, J., Carr, J., Klessig, D., and Raskin, I. (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**, 1002-1004.
- Maleck, K., and Dietrich, R. A. (1999) Defense on multiple fronts : how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* **4**, 215-219.
- Mansfield, J. W., Bennet, M. H. R., Bestwick, C. S., and Woods-Toer, A. (1997) Phenotypic expression of gene-for-gene interaction involving fungal and bacterial pathogens: variation from recognition to response. In: *The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions*. Crute, I.R., Holub, E. B. and Burdon, J. J. eds. CAB International, 265-291.
- Martin, G. B. (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 273-279.
- Martinez, C., Montillet, J. L., Bresson, E., Agnel, J. P., Daniel, J. F., Geiger, J. P., and Nicole, M. (1998) Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1038-1047.
- Martinez, C., Baccou, J. C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J. F., Jalloul, A., Montillet, J. L., Geiger, J. P., Assigbetsé, K., and Nicole, M. (2000) Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in the local and systemic resistance of cotton

- challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* race 18. *Plant Physiol.* **122**, 757-766.
- Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. and Baccou, J. C.** (2001). Active cellulase elicits concomitant jasmonate and salicylic acid pathways in melon plants (*Cucumis melo*) while heat-denaturated cellulase induces the salicylic acid-dependent pathway only. *Plant Physiol.* **125**, 334-344.
- Martini, D., Iacazio, G., Ferrand, D., Buono, G. and Triantaphylidès, C.** (1994) Optimization of large scale preparation of 13(S)-hydroperoxy-9Z,11^E octadecadienoic acid using soybean lipoxygenase. Application to the chemoenzymatic synthesis of (+) coriolic acid. *Biocatalysis* **11**, 47-63.
- Massey, R. E.** (1929) Blackarm disease of cotton : the development of *Pseudomonas malvacearum* E.F. Smith within the cotton plant. *Emp. Cot. Grow. Rev.* **6**, 124-46.
- Massey, R. E.** (1930a) Studies on blackarm disease of cotton. **1.** *Emp. Cot. Grow. Rev.* **7**, 181-95.
- Massey, R. E.** (1930b) Studies on blackarm disease of cotton. **2.** *Emp. Cot. Grow. Rev.* **7**, 181-95.
- Mateos, F. V., Rickauer, M., and Esquerré-Tugayé, M. T.** (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* that shows cellulose-binding and lectin-like activities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 1045-1053.
- Mathieu, Y., Kurkdjian, A., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, M. D., O'Neill, M., Albersheim, P., and Darvill, A.** (1991) Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J.* **1**, 333-343.
- Matsui K., Hijiya K., Tabuchi Y., and Kajiwara T.** (1999) Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. *Plant Physiol.* **119**, 1279-88.
- Mauch-Mani, B., and Slusarenko, A. J.** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas parasitica*. *Plant Cell* **8**, 203-212.
- May, M. J., Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. G.** (1996) Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* **110**, 1367-1379.
- Mayer, B., and Hemmens, B.** (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 477-481.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., and Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Pro. Natl., Acad. Sci. USA* **94**, 5473-5477.
- McGurl, B., Orozco-Cardenas, M., Pearce, G., and Ryan, C. A.** (1994) Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9799-9802.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., and Ryan, C. A.** (1992) Structure, expression,

- and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255, 1570-1573.
- Mehdy, M. C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105, 467-472.
- Mehdy, M. C., Sharma, Y. K., Sathasivan, K., and Bays, N. W. (1996) The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Plant Physiol.* 98, 365-374.
- Melan, M. A., Dong, X. N., Endara, M. E., Davis, K. R., Ausubel, F. M. and Peterman, T. K. (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 101, 441-450.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., and Inverardi, B. (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004-1006.
- Midland, S. L., Keen, N. T., Sims, J. J., Midland, M. M., Burton, V., Smith, M. J., Mazzola, E. P., Graham, K. J., and Clardy, J. (1993) The structures of syringolides 1 and 2, novel c-glycosidic elicitors from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Org. Chem.* 58, 2940-2945.
- Mikes, V., Milat, M. L., Ponchet, M., Ricci, P., and Blein, J. P. (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* 416, 190-192.
- Milat, M. L., Ricci, P., Bonnet, P., and Blein, J. P. (1991) Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytochemistry* 30, 2171-2173.
- Mittler, R., Feng, X., and Cohen, M. (1998) Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10, 461-473.
- Mittler, R., and Lam, E. (1995) Identification, characterization, and purification of tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response. *Plant Cell* 7, 1951-1962.
- 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. *Plant Cell* 8, 1991-2001.
- Morel, J. B., and Dangl, J. L. (1997) The hypersensitive response and identification of cell death in plants. *Cell Death Different.* 4, 671-683.
- Montillet, J. L., Agnel, J. P., Ponchet, M., Vaillau, F., Roby, D. and Triantaphylidès, C. (2002) Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiol. Biochem.* (in press).
- Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E., and Zenk, M. H. (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7490-7494.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Liu, Y., and Chatterjee, A. K. (1997) Molecular characterization and expression of the *Erwinia carotovora* hrp_{N_{Ecc}} gene, which encodes an elicitor of the hypersensitive reaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 462-471.
- Mur, L. A. J., Bi, Y. M., Darby, R. M., Firek, S., and Draper, J. (1997) Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increase viral dispersal during lesion establishment in TMV-infected tobacco. *Plant J.* 12, 1113-1126.
- Mur, L. A. J., Naylor, G., Warner, S. A. J., Sugars, J. M., White, R. F., and Draper, J. (1996) Salicylic acid potentiates defense gene expression in tissue exhibiting acquired

- resistance to pathogen attack. *Plant J.* **9**, 559-571.
- Nespoulos, C., Huet, J. C., and Pernollet, J. C. (1992) Structure- function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* **186**, 551-557.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H., and Ryals, J. (1995) Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* **8**, 227-233.
- Nicole M., Daniel J. F., Bresson E., Martinez C., El-Bachir O., Lopez F., Assigbetsé K., Fernandez D., Montillet J. L., and Geiger J. P. (1998). The hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Rec. Res. Develop. Microbiol.* **2**, 641-654.
- Noir, S. et Lashermes, P. (2000) Organisation et évolution des gènes de résistance chez les plantes. *Agriculture* **9**, 301-309.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E. T. (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 430-438.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1995) Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2338-2342.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- Ohta, H., Shida, K., Peng, Y.L., Furusawa, I., Shishiyama, J., Aibara, S., and Morita, Y. (1991) A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiol.* **97**, 94-98.
- Ono, E., Wong, H. L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., and Shimamoto, K. (2001) Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 759-764.
- Orozco-Cárdenas, M. L., and Ryan, C. A. (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6553-6557.
- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., and Ryan, C. A. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **13**, 179-191.
- Pandian, S. K., Somasundaram, T., Jayaraman, J., and Lakshmanan, M. (1982) A new toxin isolated from *Xanthomonas malvacearum* which inhibits mitochondrial ATP-ADP translocase. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 768-70.
- Parker, J. E., Schulte, W., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* **91**, 821-832.
- Parry, G. (1982) Le cotonnier et ses produits. *Technique en Agriculture et Production Tropicale* (Lavoisier).

- Pena-Cortes, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E. W., and Willmitzer, L.** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**, 123-128.
- Peng, Y. L., Shirano, Y., Ohta, H., Hibiuro, T., Tanaka, K. and Shibata, D.** (1994) A novel lipoxygenase from rice. Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J. Biol. Chem.* **269**, 3755-3761.
- Penninckx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Métraux, J. P., and Broekaert, W. F.** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathway is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., de Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J. P., Manners, J. M., and Broekaert, W. F.** (1996) Pathogen-induced systemic activation of plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- Pompella, A.** (1997) Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **67**, 289-297.
- Pontier, D., Balagué, C. and Roby, D.** (1998) The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris, Serie III - Sciences de la Vie* **321**, 721-734.
- Popham, P., Pick, S., and Novacky, A.** (1995) The effect of harpin from *Erwinia amylovora* on the plasalemma of suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**, 39-50.
- Porta, H., Rueda-Benitez, P., Campos, F., Colmenero-Flores, J. M., Colorado, J. M., Carmona, M. J., Covarrubias, A. A. and Rocha-Sosa, M.** (1999) Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol.* **40**, 850-858.
- Porter, N. A., Caldwell, S. A., and Mills, K. A.** (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**, 277-290.
- Price, A. H., Taylor, A., Ripley, S. J., Griffiths, A., Trewavas, A. J., and Knight, M. C.** (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**, 1301-1310.
- Pugin, A., Frachisse, J. M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J.** (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Radjasehar, V. K., Lamb, C., and Dixon, R. A.** (1999) Early in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Plant Physiol.* **120**, 1137-1146.
- Rancé, I., Fournier, J., and Esquerré-Tugayé, M. T.** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6554-6559.
- 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 Physiol.* **97**, 1342-1347.
- Rate, D. N., Cuenca, J. V., Bowman, G. R., Guttman, D. S., and Greenberg, J. T.** (1999) The gain-of function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of

- salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* **11**, 1695-1708.
- Raz, V., and Fluhr, R. (1993) Ethylene signal is trasduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* **5**, 523-530.
- Ren, Y. Y., and West, C. A. (1992) Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oriza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol.* **99**, 1169-1178.
- Ren, D., Yang, H., and Zhang, S. (2002) Cell death mediated by mitogen-activated protein kinase is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 559-565.
- Reymond, P., and Farmer, E. E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Cur. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.
- Ricci, P. (1997) Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins : the case of elicitors. In: Stacey, G., Keen, N. T. (eds) *Plant-Microbe Interactions*, 53-75. Chapman Hall, New York, NY.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J. C., Sallantin, M. Bauvais-cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., and Pernollet, J. C. (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* **183**, 555-563.
- Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T., and Symons, M. C. R. (1991) Techniques in free radical research. In Burdon, R. H., and van Knippenberg, P. H. (eds), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. 291p.
- Rickauer, M., Brodschelm, W., Bottin, A., Véronési, C., Grimal, H., and Esquerré-Tugayé, M. T. (1997) The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta* **202**, 155-162.
- Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J., and Reeves, H. C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290-294.
- Rolfs, F. M. (1935) Dissemination of the bacterial organism. *Phytopathology* **25**, 971.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessing, D. F., Hirt, H., and Jones, J. D. (1999) Rapid Avr9-and Cf-9-dependent activation of MAP Kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-287.
- Romeis, T., Piedras, P., and Jones, J. D. (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* **12**, 803-816.
- Rosahl, S. (1996) Lipoxygenase in plants. Their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.* **51c**, 123-138.
- Roussel, S., Nicole, M., Lopez, F., Geiger, J. P., Ricci, P., Renard, M., and Brun, H. (1999) *Leptosphaeria maculans* and cryptogein induce similar vascular responses in tissues undergoing the hypersensitive reaction in *Brassica napus*. *Plant Sci.* **144**, 17-28.
- Roy, S., Pouénat, M. L., Caumont, C., Cariven, C., Prevost, M. C., and Esquerré-Tugayé, M. T. (1995) Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Sci.* **107**, 17-25.
- Roy, P., Roy, S. K., Mitra, A., and Kulkarni, A. P. (1994) Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochim. et Biophys. Acta* **1214**, 171-

179.

- Royo, J., Leon, J., Vancanneyt, G., Albar, J. P., Rosahl, S., Ortego, F., Castanera, P., and Sánchez-Serrano, J. J. (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1146-1151.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A. G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S., and Sánchez-Serrano, J. J. (1996) Characterization of three potato lipoxygenase with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* **271**, 21012-21019.
- Rustérucci, C., Blein, J. P., Stallaert, V., Ducruet, J. M., Pugin, A., and Ricci, P. (1996) Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* **111**, 885-891.
- Rustérucci, C., Montillet, J. L., Agnel, J. P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J. J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J. P., and Triantaphylidès, C. (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **274**, 36446-36455.
- Ryan, C. A. (1992) The search for proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* **19**, 123-133.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mole. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sandstrom, P. A., Pardi, D., Tebbey, P. W., Dudek, R. W., Terrian, D. M., Folks, T. M. and Buttke, T. M. (1995) Lipid hydroperoxide-induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression. *FEBS Lett.* **365**, 66-70.
- Sano, H., and Ohashi, Y. (1995) Involvement of small GTP-Binding proteins in defense signal-transduction pathways of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4138-4144.
- Saravitz, D. M., and Siedow, J. N. (1996) The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. *Plant Physiol.* **110**, 287-299.
- Savouré, A., Sallaud, C., El-Turk, J., Zuanazzi, J., Ratet, P., Schuttze, M., Kondorosi, A., Esnault, R., and Kondorosi, E. (1997) Distinct response of Medicago suspension cultures and roots to nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. *Plant J.* **11**, 277-287.
- Saunders, J. H., and Innes, N. L. (1963) The genetics of bacterial blight resistance on cotton : further evidence on the gene B6m. *Genet. Res.* **4**, 382-388.
- Schaller, A. (1999) Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* **40**, 763-769.
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 305-310.
- Schenk, P. M., Kazan, I., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., and Manners, J. M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 11655-11660.
- Schnathorst, W. C., Halisky, P. M., and Martin, R. D. (1960) History, distribution, races and disease cycle of *Xanthomonas malvacearum* in California. *Plant Dis. Rep.* **44**, 603-608.

- Schneider, C., and Brash, A. R. (2000) Stereospecificity of hydrogen abstraction in the conversion of arachidonic acid to 15R-HETE by aspirin-treated cyclooxygenase-2. Implications for the alignment of substrate in the active site. *J. Biol. Chem.* **275**, 4743-4746.
- Schneider, C., Boeglin, W. E., Prusakiewicz, J. J., Rowlinson, S. W., Marnett, L. J., Samel, N., and Brash, A. R. (2002) Control of prostaglandin stereochemistry at the 15-carbon by cyclooxygenase-1 and -2. A critical role for serine 530 and Valine 349. *J. Biol. Chem.* **277**, 478-485.
- Schweizer, P., Buchala, A., and Métraux, J. P. (1997) Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiol.* **115**, 61-70.
- Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W., and Staskawicz, B. J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**, 2063-2065.
- Séjalon-Delmas, N., Mateos, F. V., Bottin, A., Rickauer, M., Dargent, R., and Esquerré-Tugayé, M. T. (1997) Purification, elicitor activity, and cell wall localization of a glycoprotein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, a fungal pathogen of tobacco. *Phytopathology* **87**, 889-909.
- Sembdner, G., and Parthier, B. (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonate. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 569-589.
- Seo, S., Sano, H., and Ohashi, Y. (1999) Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco Mitogen-Activated Protein Kinase. *Plant Cell* **11**, 289-298.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., et al. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4788-4793.
- Seskar, M., Shulaev, V., and Raskin, I. (1998) Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiol.* **116**, 387-392.
- Sessa, G., and Martin, G. B. (2000) Protein Kinases in the plant defense response. *Adv. Bot. Res.* **32**, 378-404.
- Shah, J., Kachroo, P., and Klessig, D. F. (1999) The *Arabidopsis* *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**, 191-206.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N., and Okazaki, M. (1998) Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scoplin in tobacco cell cultures. *Plant Sci.* **132**, 13-19.
- Sharp, J. K., Mc Neal, M., and Albersheim, P. (1984) The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa (β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* **259**, 11321-11336.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A., and Lamb, C. (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**, 261-270.
- Shulaev, V., Leon, J., and Raskin, I. (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic

- acquired resistance in tobacco. *Plant Cell* **7**, 1691-1701.
- Shulaev, Silverman, P., and Raskin, I.** (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**, 718-721.
- Siedow, J. N.** (1991) Plant lipoxygenase: Structure and Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 145-188.
- Simon-Plas, F., Rustérucchi, C., Milat, M. L., Humbert, C., Montillet, J. L., and Blein, J. P.** (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ.* **20**, 1573-1579.
- Simpson, T. D., and Gardner, H. W.** (1995) Allene oxide synthase and allene oxide cyclase, enzymes of the jasmonic acid pathway, localized in *Glycine max* tissues. *Plant Physiol.* **108**, 199-202.
- Sinha, P. P., and Verma, J. P.** (1983) Role of phylloplane bacterial blight of cotton. *Int. J. Trop. Plant dis.* **1**, 125-128.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B., and Rothstein, S. J.** (2000) Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.* **122**, 1335-1342.
- Slusarenko, A. J.** (1996) In *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes* (Piazza, G., ed). Champaign, IL : AOCS Press, pp. 176-197.
- Slusarenko, A. J., Meier, B. M., Croft, K. P. C., and Eiben, H. G.** (1993) Lipoxygenase in plant disease. In *Mechanisms of plant defence responses*. (Fritig, B, Legrand, M. eds). Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, pp. 211-220.
- Smith, E. F.** (1920) Bacterial disease of Plants. Saunders Co, Philadelphia.
- Smith, J. J., Linforth, R., and Tucker, G. A.** (1997) Soluble lipoxygenase isoforms from tomato fruit. *Phytochemistry* **45**, 453-458.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., and Levine, A.** (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**, 431-443.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N., and Napoli, C.** (1984) Cloned avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycines max* (L.) Merr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6024-6028.
- Steczko, J., Donoho, G. P, Clemens, J. C., Dixon, J. E., and Axelrod, B.** (1992) Conserved histidines residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement. *Biochemistry* **31**, 4053-4057.
- Stepanova, A. N., and Ecker, J. R.** (2000) Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 353-365.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J. P.** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 235-370.
- Stoughton, R. H.** (1933) The influence of environmental conditions on the development of the angular leaf spot disease of cotton. 5. The influence of alternating and varying conditions on infection. *Ann. Appl. Biol.* **20**, 590-611.
- Summermatter, K., Sticher, L., and Métraux, J. P.** (1995) Systemic response in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* **108**, 1379-1385.

- Suzuki, K., Yano, A., and Shinshi, H. (1999) Slow and prolonged activation of the P47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiol.* **119**,1465-1472
- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y., and Martin, G. B. (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**, 2060-2063.
- Tang, X., Xie, M., Kim, Y. J., Zhou, J., Klessig, D. F., and Martin, G. B. (1999) Overexpression of *Pto* activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell* **11**,15-29.
- Tarr, S. A. J. (1958) Seed treatment of cotton against diseases and insect pests. *Out. Agric.* **2**, 168-77.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J. P., and Pugin, A. (1995) Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of a hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.* **109**, 1025-1031.
- Tenhaken, R. and Rübel, C. (1997) Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. *Plant Physiol.* **115**, 291-298.
- Tepfer, D., Boutteaux, C., Vignon, C., Aymes, S., Perez, V., O'Donohue, M. J., Huet, J. C., and Pernellet, J. C. (1998) *Phytophthora* resistance through production of a fungal production of a fungal protein elicitor (β -cryptogein) in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 64-67.
- 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.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Tierens, K. F. M. J., and Broekaert, W. F. (1999) Requirement of functional *Ethylene-Insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121**, 1093-1101.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Broekaert, W. F., and Cammue, B. P. A. (2000) Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 421-427.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Thulke, O., and Conrath, U. (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant J.* **14**, 35-42.
- Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negretto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E., and Ryals, J. (1993) Regulation of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1029-1034.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., and Ishida, I. (1997) The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1029-1034.
- Van der Biezen, E. A., and Jonathan, D. G. J. (1998) Plant disease-resistance proteins and the

- gene-for-gene concept. *Trends Plant Sci.* **23**, 454-456.
- Van Ginkel, G., and Sevanian, A. (1997) Lipid peroxydation-induced membrane structural alterations. *Methods Enzymol.* **233**, 273-288.
- Van Wees, S. C. M. V., Swart, E. A. M. D., Van Pelt, J. A. V., Van Loon, L. C. V., and Pieterse, C. M. J. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8711-8716.
- Vera-Estrella, R., Higgins, V. J., and Blumwald, E. (1994) Plant defense response to fungal pathogens. II. G-protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiol.* **106**, 97-102.
- Verberne, M. C., Verpoorte, R., Bol, J. F., Mercado-Blanco, J., and Linthorst, H. J. M. (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* **18**, 779-783.
- Verma, J. P. (1986) Bacterial blight of Cotton. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Verma, J. P., and Singh, R. P. (1971) Epidemiology and control of bacterial blight of cotton. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* **74**, 326-31.
- Verma, J. P., and Singh, R. P. (1970) Two new races of *Xanthomonas malvacearum* the cause of blackarm of cotton. *Cot. Grow. Rev.* **47**, 203-5.
- Verma, J. P., and Singh, R. P. (1971b) Pectic and cellulolytic enzymes of *Xanthomonas malvacearum* and the incidence of bacterial blight of cotton. *Curr. Sci.* **40**, 21-2.
- 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 Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **9**, 55-63.
- Verma, J. P., and Singh, R. P. (1974b) Recent studies on the bacterial diseases of fibre and oil seed crops in India. In: *Current Trends in Plant Pathology*. Raychauhuri, S.P. and Verma, J.P. eds. Lucknow University, India, 134-145.
- Verma, J. P., Nayak, M. L., and Singh, R. P. (1977) Survival of *Xanthomonas malvacearum* under North Indian conditions. *Ind. Phytopathol.* **30**, 361-5.
- Verma, J. P., Singh, R. P. and Nayak, M. L., (1975) Laboratory evaluation of chemicals against *Xanthomonas malvacearum* the incidence of bacterial blight of cotton. *Ind. Phytopathol.* **28**, 170-3.
- 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.
- Véronési C., Fournier J., Rickauer M., Marolda M., and Esquerré-Tugayé M. T. (1995) Nucleotide sequence of an elicitor-induced tobacco lipoxigenase cDNA (GenBank X84040) (PGR95-009). *Plant Physiol.* **108**, 1342.
- Véronési, C. Rickauer, M., Fournier, J., Pouénat, M. L., and Esquerré-Tugayé, M. T. (1996) Lipoxigenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. *Plant Physiol.* **112**, 997-1004.
- Véronési, C., Pouénat, M. L., Rickauer, M., and Esquerré-Tugayé, M. T. (1999) Regulation de la lipoxigenase by methyl jasmonate and fatty acids. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie* **322**, 491-497.

- Vijyan, P., Shockey, J., Lévesque, C. A., Cook, R. J., and Browse, J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7209-7214.
- Vina, D., and Granada, G. A. (1986) Evaluation of the production of certified cotton seed in relation to the incidence of angular leaf spot. *Rev. Plant Pathol.* **67**, 142.
- Virad, M. P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P., and Blein, J. P. (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* **104**, 1245-1249.
- Wang, G. L., Ruan, D. L., Song, W. Y., Sideris, S., Chen, L., Pi, L. Y., Zhang, S., Zhang, Z., Fauquet, C., Gaut, B. S., Whalen, M. C., and Ronald, P. C. (1998) *Xa21D* encodes a receptor-like molecule with a Leucine-Rich Repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**, 765-779.
- Wang, C., Zien, C. A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D. F., and Wang, X. (2000) Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2237-2246.
- Ward, E., Uknes, S., Williams, S., Dincher, S., Wiederhold, D., Alexander, D., Ahl-Goy, P., and Ryals, J. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094.
- Wardman, P. (1993) Free radicals: nature's way of saying NO or molecular murder. *Gray Laboratory Annual Report*, 1-7
- Wasternack, C., and Parthier, B. (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* **2**, 302-306.
- Weber, H., Chételat, A., Caldelari, D., and Farmer E. E. (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**, 485-493.
- Wei, Z. M., Beer, S. V. (1993) HrpI of *Erwinia amylovora* functions in secretion of harpin and is a member of a new protein family. *J. Bacteriol.* **175**, 7958-7967.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., He, S. Y., Collmer, A., and Beer, S. V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Nature* **257**, 85-88.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C., and Feussner, I. (1999) Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves – preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Lett.* **464**, 133-137.
- Weindling, R. (1948) Bacterial blight of cotton under conditions of artificial inoculation. *US Dep. Agr. Tech. Bul.* N° 956.
- Wells, P. G., Kim, P. M., Laposa, R. R., Nicol, C. J., Parman, T., and Winn, L. M. (1997) Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mut. Res.* **396**, 65-78.
- Wendehenne, D., Binet, M. N., Blein, J. P., Ricci, P., and Pugin, A. (1995) Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett.* **374**, 203-207.
- Wendehenne, D., Durner, J., Chen, Z. X., and Klessig, D. F. (1998) Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* **4**, 651-657.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F., and Durner, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.

- Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H. Y., and Ryals, J. (1995) Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. *Plant Cell* **7**, 2013-2022.
- Wickens, G. M. (1956) Vascular infection of cotton by *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dow. *Ann. Appl. Biol.* **44**, 129-37.
- Winston, G. W. (1990) Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In Alscher R. G. and Cumming J. R. (eds), *Stress responses in plants: adaptation and acclimatation mechanisms*. Wiley-Liss, New-York, pp. 57-86.
- Wisniewski, J. P., Gardner, C. D., and Brewin, N. J. (1999) Isolation of lipoxygenase cDNA clones from pea nodule mRNA. *Plant Mol. Biol.* **39**, 775-783.
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**, 681-692.
- Wright, R.J., Thaxton, P.M., El-Zik, K.M. and Patreson, A.H. (1996) D-subgenome bias of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* resistance genes in tetraploid *Gossypium* (cotton) suggests that polyploid formation has created novel avenues for evolution. *Genetics* **149**, 1987.
- Wu, G. S., Short, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C., and Shah, D. M. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* **7**, 1357-1368.
- Wu, G. S., Short, B. J., Lawrence, E. B., Leon, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Baskin, I., and Shah, D. M. (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.* **115**, 427-435.
- Xu, H., Chang, P. F., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghobama, K. G., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077-1085.
- Xu, H., and Heath, M. C. (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of cowpea rust fungus. *Plant Cell* **10**, 585-597.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., and Shibuya, N. (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell* **12**, 817-826.
- Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D. F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Gene Dev.* **11**, 1621-1639.
- Yang, K. Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 741-746.
- Yano, A., Suzuki, K., Uchimiya, H., and Shinshi, H. (1998) Induction of hypersensitive cell death by a fungal protein in cultures of tobacco cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 115-123.
- Yu, L. M. (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4088-4094.
- Zhang, Y. Y., Radmark, O., and Samuelsson, B. (1992) Mutagenesis of some conserved

residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 485-489.

Zhang, S., and Klessig, D. F. (1997) Salicylic acid activates a 48-Kda MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**, 809-824.

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

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

Zhang, H., Xu, Q., Krajewska, M., Xie, Z., Fuess, S., et al. (2000) BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2597-2602.

Zhou, J., Loh, Y. T., Bressan, R. A., and Martin, G. B. (1995) The tomato *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in the hypersensitive response. *Cell* **83**, 925-935.

Zhou, J., Tang, X., and Martin, G. B. (1997) The *Pto* kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* **16**, 3207-3218.

Zimmermann, S., Nürnberger, T., Franchisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., and Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2751-2755.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Articles publiés ou sous presse

1. Assigbetsé, K., Cuny, G., Valette, V., Delannoy, E., Bresson, E., Jalloul, A., Daniel, J.F., Geiger, J.P. and Nicole, M. 1999. Cloning and characterization of a bacterial-induced Peroxidase encoding cDNA from cotton (GenBank accession No. AF155124). **Plant Physiology**, 121: 312.
2. Martinez M., Baccou J.C., Bresson E., Baissac Y., Daniel J.F., Jalloul A., Montillet J.L., Geiger J.P., Assigbetsé K., and Nicole, M. 2000. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in the local and systemic resistance of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* race 18. **Plant Physiology**, 122: 757-766.
3. Jalloul, A., Montillet, J.L., Assigbetsé, K., Agnel, J.P., Delannoy, E., Daniel, J.F., Marmey, P., Geiger, J.P. et Nicole, M. 2002. Lipid peroxidation in *Xanthomonas*-infected cotton is 9S-lipoxygenase dependent during hypersensitive cell death and results from autoxidation during disease. **Plant Journal**, sous presse.
4. Assigbetsé, K., Jalloul, A., Delannoy, E., Daniel, J.F., Marmey P., Geiger, J.P. et Nicole, M. 2002. Molecular cloning and characterization of a bacterial-induced lipoxygenase encoding cDNA from cotton. **DNA sequence**, sous presse.

Articles soumis ou en préparation

5. Jalloul, A., Audran, M., Montillet, J.L., Delannoy, E., Agnel, J.P., Daniel, J.F., Assigbetsé, K., Clerivet, A., Marmey, P., Geiger, J.P. et Nicole, M. 2002. Hypersensitive cell death of *Xanthomonas*-infected cotton cells / 9-lipoxygenase / jasmonic acid. **Plant Journal**, en préparation
6. Delannoy, E., Assigbetsé, K., Jalloul, A., Daniel, J.F., Marmey P., Geiger, J.P., Martinez C., Lherminier, J., Fernandez, D. et Nicole, M. 2002. Differential expression of peroxidase genes during the hypersensitive response of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, en préparation

Communications et affiches

7. Martinez, C., Bresson, E., Assigbetsé, K., Jalloul, A., Delannoy, E., Daniel, J.F., Fernandez, D., Campa, C., Montillet, J.L., Geiger, J.P. et Nicole, M. 1999. Peroxidases in the hypersensitive reaction of cotton plants to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9^{ème} Congrès International, Amsterdam, juillet.
8. Jalloul, A., Montillet, J.L., Daniel J.F., Agnel J.P., Assigbetsé, K., Delannoy, E., Marmey, P., Geiger, J.P. et Nicole, M. 2000. Activation delipoxygénases durant la RH du cotonnier à *Xanthomonas*. **Congrès AUPELF**, Montpellier.
9. Jalloul, A., Montillet, J.L., Daniel J.F., Agnel J.P., Assigbetsé, K., Delannoy, E., Marmey, P., Geiger, J.P. et Nicole, M. 2001. Activation de lipoxygénases durant la réaction hypersensible du cotonnier (*Gossypium hirsutum*) à *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. 5^{ème} congrès de la Société Française de Phytopathologie, Angers
10. Delannoy E., Assigbetsé K., Marmey P. Jalloul, A., Daniel J.F., Geiger J.P. et Nicole M. 2001. Caractérisation moléculaire et cellulaire des peroxydases associées à la résistance du cotonnier à *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum* (Xcm). 5^{ème} congrès de la Société Française de Phytopathologie, Angers.

11. Delannoy, E., A. Jalloul, A., K. Assigbetsé, J.F. Daniel, P. Marmey, J.P. Geiger et M. Nicole. 2001. Molecular characterisation of cotton peroxidases associated with the HR to *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. **XI congrès Molecular Plant-Microbe Interactions**. Madison, États-Unis.
12. Jalloul A., Montillet J.L., Delannoy E., Daniel J.F., Agnel J.P., Assigbetsé K., Marmey P., Geiger J.P. et Nicole M. 2002. Mort cellulaire chez le cotonnier au cours de l'interaction plante -*Xanthomonas*. **Colloque Bactériologie Aussois**, Janvier.
13. Jalloul, A., Montillet, J.L., Delannoy, E., Assigbetsé, K., Daniel J.F., Agnel, J.P., Marmey, P., Geiger, J.P., Clériveret A., Audran, A. et Nicole, M. 2002. Rôle des lipoxygénases dans la résistance du cotonnier à la bactériose. **Congrès AUPELF**, Marrakech (Maroc), octobre.

**LIPID PEROXIDATION: ORIGIN AND ROLE IN COTTON (*Gossypium hirsutum*)
HYPERSENSITIVE CELL DEATH TO *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum***

Resistance of cotton plants to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* (*Xcm*) leads to the hypersensitive reaction (HR). In the incompatible interaction between the cultivar Reba B50, carrying the B₂B₃ blight resistance genes, and the avirulent race 18 of *Xcm*, we studied whether lipid peroxidation was associated with hypersensitive cell death.

First, we report that the HR was characterized by correlated events such as (1) a massive production of 9S-lipid hydroperoxides, (2) the increase of 9S-lipoxygenase (LOX) activities 9 and 24 hours post-infection (pi), and transcription of a cotton LOX gene (*GhKLox 1*), (3) water loss and (4) HR symptoms. During disease developed by this cotton cultivar when infected with the virulent race 20 of *Xcm*, a less intense and late 9S LOX-dependent lipid peroxidation was also observed (72 hours pi), correlated to leaf chlorosis, but not necrosis.

Second, we investigated on signalling pathways involved in LOX activation. We evidenced that both salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) were able to induce the *GhkLox1* gene transcription and stimulate the 9S-LOX activity 24h. Assessment of JA synthesis according to both interactions, revealed a sharp and early accumulation (2 hours pi) during HR, before the oxidative burst (3hours pi) and SA production (6hours pi). These data suggest that JA may play a key role in the hypersensitive cell death.

Keywords: hypersensitive response, lipoxygenase, lipid peroxidation, salicylic acid, and jasmonic acid, resistance, cotton, *Xanthomonas*.

LA PEROXYDATION DES LIPIDES : ORIGINE ET ROLE DANS LA MORT CELLULAIRE HYPERSENSIBLE DU COTONNIER

(*Gossypium hirsutum*) A *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*

La résistance du cotonnier à *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum* (*Xcm*) se caractérise par une réaction hypersensible (RH). Au cours de l'interaction incompatible entre le cultivar Réba B50, qui contient les gènes B₂B₃ de résistance à la bactériose, et la race 18 avirulente de *Xcm*, nous avons étudié la place de la peroxydation des lipides dans la mort cellulaire de type hypersensible.

Dans un premier temps, une peroxydation des lipides a été identifiée au cours de la HR, corrélée à (1) une activité 9S-lipoxygénase (LOX) 24 heures post-infection (pi) et à la transcription du gène de LOX (*GhKLox 1*), (2) la perte en eau des tissus et (3) l'apparition du phénotype RH. Un pic d'activité 9S-LOX est également observé 9h pi. Durant la maladie causée chez ce cultivar par la race 20 virulente de *Xcm*, une peroxydation 9S LOX-dépendante plus faible et plus tardive (72heures pi) a été observée, associée à la chlorose des tissus infectés, mais pas à leur nécrose.

Dans un deuxième temps, la recherche des voies de signalisation impliquées dans l'activation de la LOX a montré que l'acide salicylique (AS) et l'acide jasmonate (AJ) étaient deux molécules capables d'induire la transcription du gène *GhkLox1* et de stimuler l'activité 9S-LOX. Une étude cinétique de la production d'AJ durant la RH a révélé une accumulation précoce et importante de cette hormone (2 heures pi), avant le choc oxydatif (3 heures pi) et le pic d'AS (6 heures pi). Ces résultats suggèrent que l'AJ pourrait jouer un rôle clef dans la mort cellulaire hypersensible.

Mot-clés: réaction hypersensible, lipoxygénase, peroxydation des lipides, acide salicylique, acide jasmonique, résistance, cotonnier, *Xanthomonas*.