

Département de Biologie
Unité de Biologie Végétale
Université de Fribourg (Suisse)

***Arabidopsis-Phytophthora*, un pathosystème modèle pour la caractérisation
d'une interaction entre une plante et un pathogène oomycète**

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Fribourg (Suisse) pour l'obtention
du grade de *Doctor rerum naturalium*

Présentée par

Alexandra Roetschi

de

Soleure, Oensingen et Bolken (SO)

Diss. No 1345

Imprimerie St-Paul, Fribourg
2001

Acceptée par la faculté des Sciences de l'Université de Fribourg (Suisse) sur la proposition du Professeur Dr. Felix Mauch, du Professeur Dr. Ulrich Gisi et du Professeur Dr. Jean-Pierre Métraux.

Fribourg, le 11 juillet 2001



Professeur Dr. Felix Mauch

Directeur de thèse



Professeur Dr. Alexander von Zelewsky

Doyen de la Faculté des Sciences

SUMMARY

Oomycetes are pathogens responsible for many plant diseases over the world and the economical impact of their damage is quite important. Although these organisms show a mycelar growth, their biology is quite different from that of fungi. This make them not easy to fight against and up to now no fungicide is able to stop an epidemy due to Oomycetes in a durable way. The particular biology of these organisms, which is still not well known, make them very interesting to study together with the study of the mechanisms of the interactions with their hosts.

A novel pathosystem using *Phytophthora porri* as pathogen, an Oomycete infecting, among other hosts, cabbage (*Brassica* sp.) and *Arabidopsis thaliana*, a little weed from the family of the Brassicacea, was established. The choice of both protagonists was justified by the feature of plant model owned by *A. thaliana* and because *P. porri* is a facultative biotroph, an advantage not shared by every Oomycete. With this pathosystem, it will be possible, for the first time, to study not only the plant-Oomycete interaction but also both organisms separately because they are amenable to molecular and genetical studies.

This thesis is the next step after my diploma work, which aim was to set up the novel pathosystem. For this, 15 accessions of *A. thaliana* and 7 isolates of *P. porri* were screened in order to find accessions that could be hosts for *P. porri* and to establish a reproducible and reliable inoculation method. The cytological characterisation of the interaction enabled to distinguish between two distinct interactions. First, an incompatible interaction in which the growth of *P. porri* is rapidly stopped by the various hindrances built up by *A. thaliana*, among them the hypersensitive reaction which represents the death of one or several cells around the location where the pathogen attempted to penetrate. Secondly, a compatible interaction, in which the colonisation of the tissue by the pathogen takes places without any visible reaction of the plant. *P. porri* is able to complete its whole life cycle by producing its vegetative and sexual structures in the plant tissue of the compatible host, which confirms that this Oomycete is a true pathogen of *A. thaliana*.

In this thesis, the implication of different biosynthetic pathways leading to resistance in *A. thaliana*, as observed in other plant-pathogen interactions, was investigated during the interaction between this plant and *P. porri*. Biochemical and molecular analysis established that the main defense pathways of *A. thaliana*, namely the salicylic acid-, the jasmonic acid- and the ethylene pathways as well as the one leading to the biosynthesis of the phytoalexins are induced during the interaction but are not the principal components of the resistance phenotype. The study of mutants impaired in these four different biosynthetic pathways resulted in the discovery that a mutant originally found in a screen for deficiency in phytoalexin accumulation after inoculation with a virulent bacteria and named *pad 2-1*, showed a hypersusceptible phenotype towards *P. porri* when all the other mutants (*npr 1-1*, *jar 1-1*, *etr 1-1*, *ein 2.1* and *pad 3-1*) and the transformant *nahG* showed, like the wild type, resistance. The induction of systemic acquired resistance, with a biotic and an abiotic inducer, helped to show that the salicylic acid pathway is not involved because there is no switch from the susceptible phenotype towards a resistant phenotype when this pathway is turned on. The biochemical and molecular analysis also showed that *pad2* is impaired in the salicylic acid pathway. So, the resistance towards *P. porri* seems to be under the control of a different mechanism than the one known so far for plant-Oomycete interactions and requires a functional *PAD2* gene. A genetical analysis showed that the resistance is under the control of at least one resistance gene and this was confirmed by the susceptible phenotype of two mutants (*ndr 1-1* and *eds 1.2*) which are impaired in the signalling pathways lying downstream of the gene-for-gene recognition events.

Another aspect investigated was the role of a small protein during the infection process. This protein is abundantly secreted by *P. porri* in liquid culture and the infiltration of a culture filtrate in leaves of *Nicotiana benthamiana*, a Solanaceous species very sensitive towards different elicitors, caused necrosis in the infiltrated area. When *A. thaliana* leaves were infiltrated with the same culture filtrate, a differential reaction was observed which indicates a recognition mechanism depending on the accession tested. The protein responsible for these reactions was identified as an elicitor and was named Porrine I. The gene coding for this protein was cloned and shown to belong to a multigene family as other elicitors produced by various *Phytophthora* species. The RNA of Porrine I could be detected during the compatible interaction but it was not possible, during this thesis, to clarify the biological function of this elicitor.

Les Oomycètes sont de redoutables pathogènes pour les végétaux, particulièrement pour les plantes de culture et les pertes annuelles occasionnées par ces organismes sont considérables. Leur biologie est très différente de celle des champignons, même s'ils partagent avec ces derniers un mode de croissance mycélaire. Ainsi, il n'est pas aisé de les combattre et il n'existe que peu de fongicides capables de stopper une épidémie de manière durable. Leur biologie particulière, encore peu connue, rend ces organismes très intéressants à étudier de même que les mécanismes régissant les interactions avec leurs hôtes respectifs.

Un nouveau pathosystème a été élaboré en utilisant *Phytophthora porri*, un Oomycète infectant, entre autres, les choux (*Brassica* sp.) comme pathogène et *Arabidopsis thaliana*, une petite Brassicacée, comme hôte. Ce choix a été motivé par le caractère de plante modèle possédé par *A. thaliana* ainsi que par la qualité de biotrophe facultatif de *P. porri*, avantage que l'on ne retrouve pas chez tous les Oomycètes. Ainsi, pour la première fois lors d'une interaction entre un Oomycète et une plante, il est possible d'étudier non seulement l'interaction mais aussi les deux partenaires aux niveaux moléculaires et génétiques.

Cette thèse a fait suite à mon travail de diplôme, dans lequel il s'est agi, à partir d'une quinzaine d'écotypes d'*A. thaliana* et de sept isolats de *P. porri*, d'une part de déterminer si cette plante pouvait servir d'hôte pour ce pathogène et d'autre part, d'établir une méthode d'inoculation fiable et reproductible. Ainsi, lorsque *A. thaliana* est infectée par *P. porri*, deux types d'interactions ont pu être observées lors de la caractérisation cytotologique. On trouve une interaction incompatible, dans laquelle *P. porri* est très rapidement stoppé dans sa progression par les différentes barrières mises en place par *A. thaliana*, dont par exemple la réaction hypersensible qui représente la mort cellulaire d'une ou de plusieurs cellules végétales à l'endroit où le pathogène a tenté de s'introduire. On observe aussi une interaction compatible, dans laquelle la colonisation du tissu par le pathogène a lieu sans qu'il y ait de réaction visible de la part de la plante. *P. porri* est ainsi capable d'effectuer son cycle de vie en élaborant ses structures de reproduction végétative et sexuée dans le tissu végétal de l'hôte compatible, ce qui confirme que cet Oomycète est un véritable pathogène pour *A. thaliana*.

Dans cette thèse, l'implication de différentes voies de biosynthèse présentes chez *A. thaliana* et conduisant à un état résistant dans d'autres pathosystèmes a été étudié dans le cadre de l'interaction entre cette Brassicacée et *P. porri*. Il a pu être établi par une analyse biochimique et moléculaire, que les principales voies de défense, à savoir celles de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique, de l'éthylène ainsi que celle conduisant à la synthèse des phytoalexines sont mises à contribution lors du processus d'infection mais qu'elles ne sont toutefois pas les principales responsables de l'état résistant. Par ailleurs, de l'étude de mutants de ces quatre différentes voies de biosynthèse, un mutant, originellement isolé lors d'un criblage pour la déficience dans l'accumulation de phytoalexines après inoculation avec une bactérie virulente et nommé de ce fait *pad 2-1*, a été mis en évidence car ce dernier a présenté un phénotype d'extrême susceptibilité envers *P. porri* alors que les autres mutants (*npr 1-1*, *jar 1-1*, *etr 1-1*, *ein 2.1*, *pad 3-1*) et le transformant *nahG*, de même que l'écotype sauvage sont eux restés résistants suite à leur inoculation avec cet Oomycète. Des expériences d'induction d'une réaction systémique acquise, effectuées à l'aide d'un inducteur biotique et abiotique, ont donné une indication supplémentaire que la voie de l'acide salicylique, qu'elle soit enclenchée ou non, n'a pas le pouvoir d'inverser un phénotype susceptible vers un phénotype résistant. Ceci a aussi permis de confirmer les résultats des analyses biochimiques et moléculaires, desquelles découlent que *pad2* est aussi empêché dans la voie de l'acide salicylique. Ainsi, la résistance envers *P. porri* semble être régie par un mécanisme différent de ce que l'on connaissait jusqu'à présent pour d'autres interactions impliquant une plante et un Oomycète et nécessite un gène *PAD2* fonctionnel. Par ailleurs, une analyse génétique a permis d'établir que la résistance envers *P. porri* est régie par au moins un gène de résistance et ceci s'est vu confirmé par le phénotype susceptible de deux mutants (*ndr 1-1* et *eds 1.1*) empêchés dans les voies de biosynthèse situées en aval de la reconnaissance gène pour gène.

Un autre aspect étudié a été le rôle d'une petite protéine lors du processus d'infection. Cette dernière est abondamment sécrétée par *P. porri* lorsqu'il est placé en culture liquide. L'infiltration d'un filtrat de culture dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*, une Solanacée très sensible envers divers éliciteurs, a causé des nécroses sur la surface infiltrée alors que chez *A. thaliana* une réaction différentielle a pu être mise en évidence, ce qui indique un processus de reconnaissance selon l'écotype testé. La protéine responsable de ces réactions a été identifiée comme étant une élicitine et a été nommée Porrine I. Le gène codant pour cette dernière a été cloné et s'est révélé faire partie d'une famille multigénique à l'instar des autres élicitines isolées chez la plupart des *Phytophthora*. L'ARN de Porrine I a pu être mis en évidence lors de l'interaction compatible toutefois il n'a pas été possible, dans le cadre de cette thèse, de clarifier la fonction biologique de cette élicitine.

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1:	Introduction générale L'interaction entre <i>Arabidopsis</i> et <i>Phytophthora</i>	1
Chapitre 2:	Characterization of an <i>Arabidopsis-Phytophthora</i> pathosystem: Resistance requires a fonctionnal <i>PAD2</i> gene and is independent of salicylic acid-, ethylene- and jasmonic acid-signaling <i>A. Roetschi, A. Si-Ammour, B. Mauch-Mani, and F. Mauch</i> <i>Submitted for publication</i>	10
Chapitre 3:	Les mécanismes de défense impliqués dans l'interaction <i>A. thaliana-</i> <i>P. porri</i> nécessitent des gènes <i>NDR1</i> et <i>EDS1</i> fonctionnels et l'état résistant ne peut être induit ni par un traitement au BTH ni par une bactérie avirulente	27
Chapitre 4:	Analyse de Porrine I, une élicitrine produite <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> par <i>Phytophthora porri</i>	44
Chapitre 5:	Conclusion générale	65
Littérature		69

INTRODUCTION GENERALE

L'interaction entre *Arabidopsis* et *Phytophthora*

Dans leur environnement naturel, les plantes sont constamment confrontées à des microorganismes d'origines diverses (bactériennes, virales ou fongiques) dont certains se révéleront être des pathogènes. Ceci implique, du côté des plantes, le développement de stratégies fort élaborées qui leur donneront la possibilité de se défendre envers ces différents envahisseurs. De même, ces derniers vont aussi développer des stratégies leur permettant de contourner les défenses mises en place par les plantes. Un aspect intéressant à étudier est comment les différents mécanismes issus des plantes et des pathogènes interagissent entre eux et quelle est leur régulation. Pour cela, il est important de se munir de bons outils d'étude, tant du côté de la plante que du côté du pathogène. Dans cette optique, un nouveau pathosystème a été mis au point, ouvrant ainsi la porte à de nouvelles investigations.

L'hôte: *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana (fausse arabette), considérée comme "mauvaise herbe" lorsqu'elle apparaît dans les jardins, est en fait un organisme particulièrement utile pour des études en laboratoire. En effet, appartenant à la vaste famille des Brassicacées (env. 340 genres et 3350 familles), elle est apparentée à des plantes de culture (par ex. le colza) ou à certains légumes tels les choux ou les radis. Sa petite taille, les commodités relatives à sa culture ainsi que son temps de génération (de graine à graine) rapide (env. 2 mois) rendent *A. thaliana* pratique à utiliser en chambre de culture. C'est aussi un bon outil pour effectuer des études génétiques car il est relativement aisé de procéder à croisements manuels sur ses fleurs, permettant ainsi de suivre un trait de caractère donné sur plusieurs générations. Par ailleurs, son génome diploïde est l'un des plus petits parmi les plantes à fleurs (123 Mbp pour 5 chromosomes) et il est totalement séquencé. C'est aussi un organisme facilement mutagénisable (par agents chimiques) et transformable (par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*), ce qui a pour conséquence de pouvoir engendrer de nombreux mutants et transformants intéressants à étudier.

Face à certains phénomènes, il est commun d'utiliser des modèles pour tenter de les expliquer. La biologie n'échappe pas à cette règle et elle recherche toujours des organismes pouvant servir de modèles pour d'autres organismes que l'on aimerait bien modéliser. Ainsi, *A. thaliana* diffère des autres organismes utilisés comme modèles par le fait que contrairement à *Saccharomyces cerevisiae* (modèle pour les eucaryotes), *Caenorhabditis elegans* ou *Drosophila melanogaster* (modèles pour le développement animal) elle est très apparentée aux espèces pour lesquelles elle peut servir de modèle. En effet, toutes les angiospermes partagent un cycle de vie, un mode de reproduction et un plan corporel plus ou moins similaire. Selon toute vraisemblance, ces dernières ont dû évoluer à partir d'un ancêtre commun, ce qui donne à penser que les gènes d'*A. thaliana* présentent une certaine homologie avec ceux de beaucoup d'autres angiospermes.

Le pathogène: *Phytophthora*

Les Oomycètes, classe à laquelle appartient le genre *Phytophthora*, sont des organismes à croissance mycélaire. Les similitudes avec les champignons s'arrêtent toutefois là; en effet, les Oomycètes, ne sont pas apparentés à ces derniers mais plutôt aux algues hétérokontes photosynthétiques (Dick, 1990; Förster *et al.*, 1990) comme l'indique la figure 1. Ils ont été classifiés à part parmi les Stramenopila (Barr, 1992), malgré le fait que l'on parle d'eux encore sous le qualificatif de champignons.

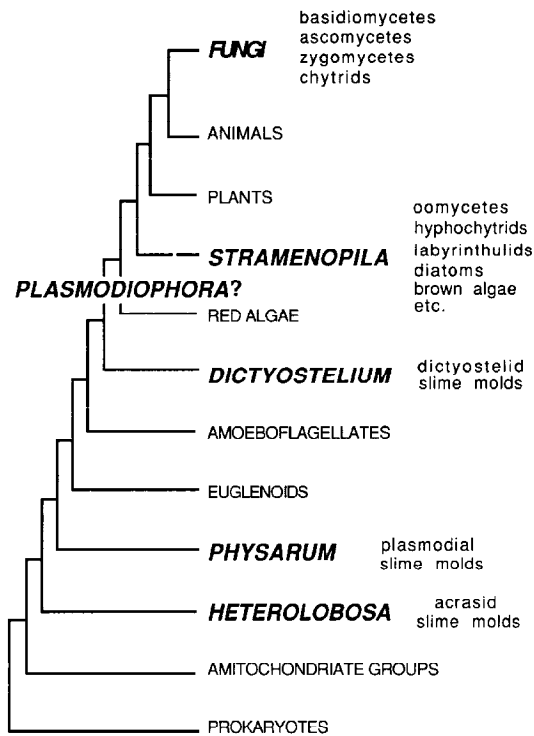


Figure 1 : Illustration de la position des Oomycètes par rapport aux champignons. Ce schéma a été réalisé sur la base d'une étude de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal. Tiré de Alexopoulos *et al.*, 1996.

La plupart des Oomycètes sont des pathogènes et sont responsables de nombreuses maladies touchant les plantes, principalement les plantes de culture. L'organisme probablement le plus connu est *Phytophthora infestans* qui s'attaque à la pomme de terre et qui a été responsable d'une famine et d'un exode sans précédents en Irlande au 19^{ème} siècle. Mais *P. infestans* n'est pas le seul à créer des problèmes, d'autres membres du genre *Phytophthora* ainsi que les espèces appartenant au genre *Pythium* sont de redoutables pathogènes lorsque les conditions climatiques sont appropriées, c'est à dire par temps humide et par une température externe oscillant entre 15 et 18°C. Les deux genres cités sont des organismes que l'on qualifie de biotrophes facultatifs car ils sont capables de survivre indépendamment de l'hôte. Parmi les Oomycètes, il y a encore quatre autres genres (*Plasmopara*, *Peronospora*, *Sclerospora* et *Peronosclerospora*) qui, eux, sont des biotrophes obligatoires, autrement dit, qui sont incapables de survivre en l'absence de leur hôte. C'est pour

cette raison qu'ils sont considérés comme étant plus évolués par rapport à *Pythium* et *Phytophthora*. Toutefois, ils restent encore dépendants des conditions atmosphériques appropriées pour effectuer leurs infections. La figure 2 illustre la phylogénie des différents genres appartenant à la classe des Oomycètes.

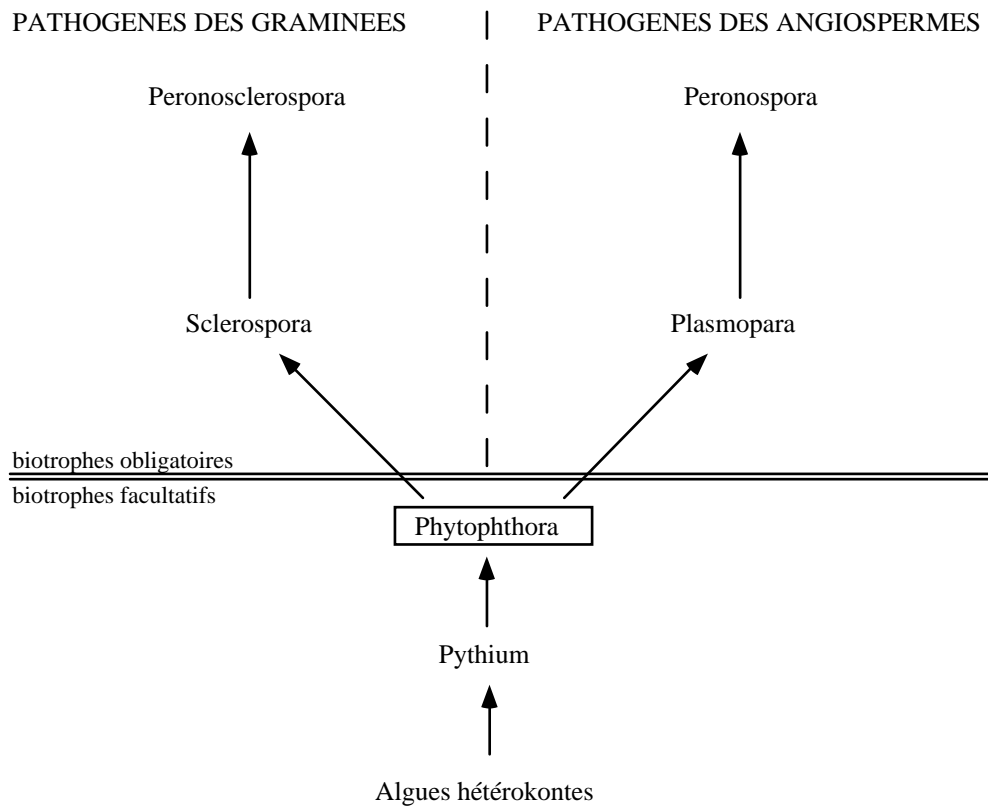


Figure 2: Illustration de la phylogénie des Oomycètes. Les algues hétérokontes sont considérées comme étant l'ancêtre commun de tous les genres. Adapté d'après Shaw, 1981.

Comme la biologie des Oomycètes est très différente de celle des champignons et qu'elle n'est pas encore très connue, il n'est pas aisé de combattre ces organismes, les fongicides classiques restant inefficaces. Ceci constitue, entre autre, une des raisons pour lesquelles il est important d'apprendre à mieux connaître ces organismes.

L'utilité d'un tel pathosytème

Plusieurs pathosytèmes impliquant un Oomycète et une plante sont étudiés à l'heure actuelle mais si l'interaction peut être étudiée, il n'en va pas de même pour l'un des deux partenaires. En effet, dans les interactions impliquant d'une part la laitue (*Lactuca sativa* L.) et *Bremia lactucae* Regel (MacLean *et al.*, 1979) et d'autre part *A. thaliana* et *Peronospora parasitica* (Koch and Slusarenko, 1990), les pathogènes sont des biotrophes obligatoires, ce qui rend leur étude en dehors de leur hôte quasiment impossible. En ce qui concerne les deux interactions suivantes, celle entre la pomme de terre et *P. infestans* (Fry *et al.*, 1997) et celle entre le soja et *Phytophthora sojae* (Schmitthenner, 1985), quelques problèmes peuvent survenir du côté des plantes. En effet, la pomme de terre étant un organisme tétraploïde, cela complique les études génétiques alors que le soja, lui, ne se laisse pas transformer ce qui peut aussi constituer un sérieux obstacle.

Ainsi l'interaction entre *A. thaliana* et Phytophthora, outre sa nouveauté, présente le grand avantage de pouvoir étudier ce qui se passe lors l'interaction mais aussi de procéder à des expériences sur les deux partenaires de manière séparée. En effet, tant *A. thaliana* que Phytophthora peuvent être étudiés au niveau génétique et moléculaire et du fait de sa qualité de biotrophe facultatif, Phytophthora est cultivable *in vitro* sur un milieu approprié.

Les objectifs

Il s'est agit tout d'abord de trouver un représentant des Phytophthora qui puisse infecter *A. thaliana*, *P. infestans* ayant été écarté vu qu'il ne déclenche qu'une réaction non-hôte chez *A. thaliana* (Kamoun *et al.* 1999). Le choix s'est donc porté sur *P. porri* qui est un organisme, initialement isolé du poireau (*Allium porrum* L.) (Foister, 1931) mais qui n'est pas un pathogène restreint aux seules Liliacées, tels les oignons (*Allium cepa* L.) ou les échalottes (*Allium bakeri* Regel) (Hickman, 1943; Katsura *et al.*, 1969). D'autres légumes, tels les choux (*Brassica* sp.) ou la carotte (*Daucus carota*) sont aussi concernés par *P. porri* (Semb, 1971; Geeson, 1976; Stelfox and Henry, 1978; Ho, 1983). Des cas de pathogénicité de la campanule (*Campanula persicifolia*), de l'oeillet (*Dianthus caryophyllus*) ou des marguerites (*Chrysanthemum* sp.) ont également été signalés (Legge, 1951; Kouyeas, 1977). *P. porri* présente une carte de distribution assez vaste car des infections, dont il a été identifié comme étant l'agent causal, ont été signalées en Europe occidentale (Italie, Belgique, Angleterre, Pays-Bas, Grèce), au Canada, en Afrique du Sud, en Australie, au Japon ainsi qu'aux Etats-Unis.

Selon une étude moléculaire effectuée sur 13 isolats de *P. porri* provenant de 5 hôtes différents, il a été observé que les isolats pathogènes des choux et de la carotte ne présentent qu'une similarité limitée avec les isolats pathogènes des Liliacées (De Cock *et al.*, 1992). Cette distinction est aussi appuyée par d'autres facteurs, dont des tests de pathogénicité. En effet, les isolats pathogènes pour le poireau ne le sont pas pour le chou et vice-versa. Il a, par conséquent, été suggéré que les isolats pathogènes des Brassicacées et de la carotte pourraient être des espèces différentes, voire des sous-espèces, malgré leur ressemblance morphologique avec les isolats pathogènes des Liliacées.

Ainsi, comme *A. thaliana* et les choux font partie de la même famille, c'est-à-dire des Brassicacées, il y avait quelque chance que les isolats de *P. porri* spécifiques aux choux soient capables d'infecter *A. thaliana*. A partir d'une quinzaine d'écotypes d'*A. thaliana* et de 7 isolats de *P. porri*, il s'est agit tout d'abord de trouver une méthode d'infection fiable et facilement reproductible. Puis des combinaisons entre les différents écotypes et isolats ont été effectués de manière à trouver des réactions différentes de la part d'*A. thaliana*. De cette première étape, deux interactions ont pu être mises en évidence, la première impliquant l'écotype Columbia et l'isolat HH et qui se solde par une réaction d'incompatibilité, c'est-à-dire que cet écotype est capable de se défendre et de stopper ainsi la progression de *P. porri*. La deuxième implique l'écotype Landsberg erecta et l'isolat HH et elle se solde par une réaction de compatibilité car *P. porri* est capable de coloniser le tissu végétal et d'effectuer son cycle de vie sur cet hôte. Avec ces deux types de réactions, l'établissement de ce pathosystème a pu être légitimé et cela a permis d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives. Durant cette thèse, qui a suivi l'élaboration du pathosystème (Roestchi, 1997), différentes expériences ont été menées à bien. Ces dernières ont permis de donner quelques réponses aux questions que l'on peut se poser quant au fonctionnement de cette interaction.

Les différentes expériences effectuées au cours de ce travail de recherche ont été regroupées en trois chapitres. Chaque chapitre faisant l'objet d'une introduction propre, les courtes introductions présentées ci-après ont pour but de servir de préambule de manière à pouvoir situer le contexte de ces expériences.

Etude de l'implication des principaux mécanismes de résistance présents chez *A. thaliana* lors de l'interaction avec *P. porri*

A. thaliana possède plusieurs mécanismes de défense qu'elle peut enclencher lorsqu'il y a menace de la part d'un pathogène, qu'il soit d'origine fongique, bactérienne ou virale. Ces différents mécanismes sont extrêmement complexes et semblent être d'une certaine manière reliés entre eux. L'implication de cinq mécanismes, à priori différents mais peut-être bien plus liés qu'on ne le pense à l'heure actuelle, a été étudiée lors de l'interaction entre *A. thaliana* et *P. porri*. La figure 3 en illustre une version schématisée.

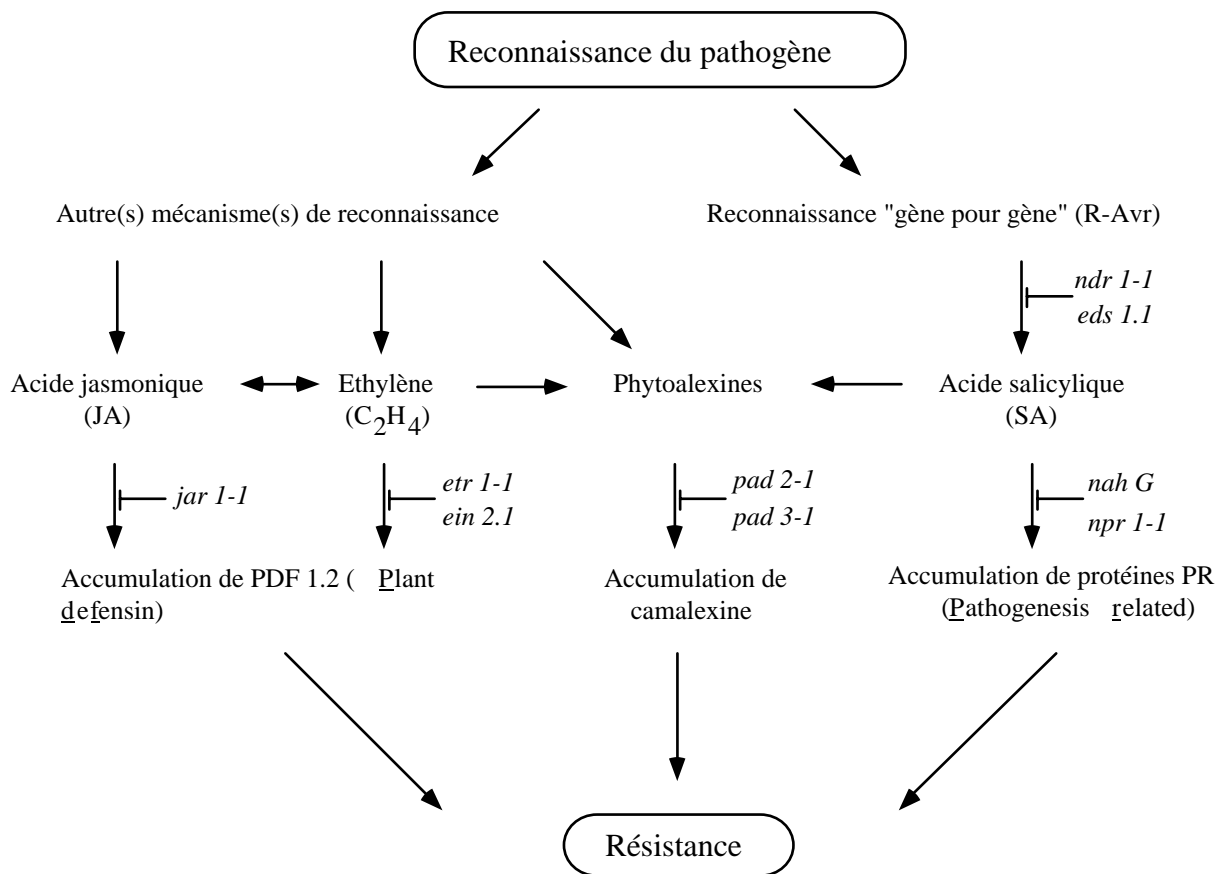


Figure 3 : Schéma, simplifié, des différentes voies de biosynthèse conduisant à un état résistant et pouvant être mises à contribution chez *A. thaliana* après que cette dernière ait perçu la présence d'un pathogène. Les mutants empêchés dans les différentes voies de biosynthèse sont indiqués en italique et seront décrits dans les chapitres traitant de leur analyse.

Dans un premier temps les analyses se sont effectuées pour les interactions entre les écotypes sauvages d'*A. thaliana* et l'isolat HH de *P. porri* puis ont été élargies à un certain nombre de mutants, préalablement sélectionnés et indiqués dans la figure 3, de ces différentes voies de défense. Une caractérisation biochimique et moléculaire a permis de déterminer quel est le rôle de ces différentes voies de biosynthèse lors de cette interaction. Une brève présentation de ces cinq voies est donnée ci-dessous.

La voie de reconnaissance R-Avr (gène pour gène)

La résistance des plantes envers un pathogène donné est souvent déterminée par l'arrière-fond génétique de ces dernières. En effet, lors des interactions impliquant les Oomycètes et leurs hôtes, la résistance est souvent due à une interaction dite "gène pour gène" (Flor, 1971). Ce mécanisme implique la présence d'un gène de résistance (R) chez l'hôte et d'un facteur d'avirulence (Avr) chez le pathogène, si ces deux composantes sont présentes, il y aura reconnaissance de la part de l'hôte et ce dernier pourra activer ses mécanismes de défense. Si toutefois l'un des deux partenaires ne possède pas de gène de résistance resp. de facteur d'avirulence, il n'y aura pas de reconnaissance et l'hôte ne pourra pas réagir assez rapidement pour éviter la colonisation de ses tissus. Ce mécanisme de reconnaissance rend évidemment l'identification des gènes R importante. Plusieurs de ces gènes présents chez les plantes dicotylédones et monocotylédones ont été clonés, ce qui a permis de fournir des indices quant à leur fonction et leur localisation dans la cellule végétale (Staskawicz *et al.*, 1995). Ces gènes présentent des caractéristiques différentes et ont été regroupés en 5 classes. La classe prédominante des produits de ces gènes, spécifiant la résistance envers des virus, des bactéries et des champignons, est cytoplasmique et possède des séquences composées d'un site de liaison nucléotidique (nucleotide binding site, NBS) ainsi que des répétitions riches en leucine (leucine rich repeats, LRR) (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Les protéines R du type NBS-LRR ont été classifiées selon les différences dans leur séquence amino-terminale. Une classe comprenant le gène RPP5 (un gène de résistance envers l'Oomycète *Peronospora parasitica*) isolé chez *A. thaliana* présente des similarités avec la partie cytoplasmique du récepteur Toll de la drosophile ainsi qu'avec des récepteurs transmembranaires interleukin-1 présents chez les mammifères (TIR), ce qui suggère une conservation fonctionnelle avec le système immunitaire des mammifères (Baker *et al.*, 1997; Medzhitov *et al.*, 1997). Une seconde classe englobe les gènes R, toujours chez *A. thaliana*, dirigés envers les bactéries *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (RPM1, RPS5 et RPS2). Ces derniers possèdent un motif leucine zipper (LZ) à la place de TIR ce qui implique un mécanisme de signalisation différent (Bent *et al.*, 1994; Mindrinos *et al.*, 1994 ; Grant *et al.*, 1995).

La voie de l'acide salicylique (SA)

De nombreuses espèces végétales, dont *A. thaliana*, sont capables de faire face à leurs pathogènes en induisant une résistance de longue durée, la résistance systémique acquise (SAR) (Ross, 1961). Cette réaction est déclenchée lorsqu'une lésion nécrotique est formée suite à l'infection par un pathogène avirulent, donc incompatible. Dès lors, un certain nombre de gènes vont être induits de manière coordonnée dans les feuilles infectées et dans celles qui ne le sont pas, conduisant à un état résistant (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992; 1993). Ces gènes codent pour des protéines, dont plus

d'une dizaine liées à la pathogénèse, les protéines PR (pathogenesis related) qui possèdent des propriétés antimicrobiennes (Van Loon and Van Kammen, 1970; Gianinazzi and Ahl, 1983). Ces types de gènes sont qualifiés de gènes SAR car l'accumulation de leur ARN messager corrèle avec la SAR (Ward *et al.*, 1991). Par ailleurs, le rôle de ces protéines dans la résistance a été confirmé par l'analyse de tabacs transgéniques surexprimant PR-1a, un des produits de gènes liés à la SAR, qui présentent une tolérance augmentée vis-à-vis de *Peronospora tabacina* et *Phytophthora parasitica* (Alexander *et al.*, 1993), deux Oomycètes pathogènes du tabac. L'acide salicylique (SA), un composé synthétisé via la voie phénylpropanoïde (Lee *et al.*, 1995), est impliqué dans la voie de transduction conduisant à la SAR car des tabacs transgéniques exprimant l'enzyme bactérienne salicylate hydroxylase (SAH), qui dégrade l'acide salicylique en catechol (Gaffney *et al.*, 1993), sont incapables de réaliser une SAR. Cependant, des greffes entre des tabacs transgéniques exprimant la SAH et des tabacs sauvages ont pu démontrer que le SA n'est pas transporté vers les parties systémiques de la plante (Vernooij *et al.*, 1994). Par conséquent, le SA n'est pas le signal systémique mais il est toutefois nécessaire pour l'induction de la SAR.

La voie de l'acide jasmonique (JA)

L'acide jasmonique (JA) est un composé ubiquiste chez les plantes qui dérive de l'acide linoléique lors d'un processus d'oxygénation, dirigé par une lipoxigénase (LOX) (Creelman and Mullet, 1995). Ce composé affecte de nombreux processus physiologiques incluant la croissance des racines, l'inhibition de la germination des graines, la sénescence des feuilles ainsi que l'ouverture des stomates (Staswick *et al.*, 1992; Sembdner and Parthier, 1993). Un rôle supplémentaire est celui de la réponse envers un stress occasionné par des pathogènes ou des insectes. Des inhibiteurs de protéinases (Farmer and Ryan, 1990), une thionine (Andresen *et al.*, 1992), une osmotine (Xu *et al.*, 1994), des protéines de la paroi cellulaire riches en prolines (Creelman *et al.*, 1992), ainsi que différentes enzymes impliquées dans les réactions de défense telles la chalcone synthase (Creelman *et al.*, 1992), la PAL (Gundlach *et al.*, 1992) ou encore la LOX (Bell and Mullet, 1995) sont induites par de faibles concentrations de JA, ce qui suggère que ce composé est actif lors de la réaction de défense. Une indication supplémentaire provient du fait que des blessures ainsi que le traitement avec des éliciteurs fongiques conduit à une augmentation de la biosynthèse du JA (Gundlach *et al.*, 1992). Par ailleurs, il a été démontré que *A. thaliana*, après avoir été infectée avec une race avirulente d'*Alternaria brassicicola*, qui est un pathogène fongique, exprime une protéine qui possède des propriétés anti-fongiques, la PDF 1.2 (plant défensin) et que cette dernière est sous le contrôle de la voie du JA (Penninckx *et al.*, 1996).

La voie de l'éthylène (C₂H₄)

L'éthylène est une hormone végétale affectant différentes étapes du développement et de la croissance d'une plante. Une augmentation de ce gaz va pouvoir influencer la germination des graines, la croissance des plantules, l'abscission des feuilles, la sénescence ainsi que la maturation

des fruits (Abeles *et al.*, 1992). La biosynthèse de ce composé est étroitement régulée et sa production est induite par certains facteurs ou stress environnementaux tels l'absence d'oxygène, par des blessures d'ordre mécanique ou dues au contact avec des pathogènes. D'autres hormones comme l'auxine ou les cytokinines, ainsi que l'éthylène lui-même, vont pouvoir influencer la production de ce gaz (Yang and Hoffmann 1984; Mattoo and Suttle, 1991). La voie de la biosynthèse est sous le contrôle de l'ACC synthase qui en est l'enzyme clef (Kende, 1993). Chez *A. thaliana*, il existe au moins 5 gènes codant pour l'ACC synthase qui présentent des expressions distinctes selon le tissu concerné et les inducteurs employés (Liang *et al.*, 1992; Van der Straeten *et al.*, 1992; Rodrigues-Pousada *et al.*, 1993; Abel *et al.*, 1995).

Il a aussi été postulé que l'éthylène est impliqué dans la voie de l'acide jasmonique car chez des plantes exposées à ce gaz, une expression de PDF 1.2 a été détectée (Penninckx *et al.*, 1996). Toutefois, il ne semble pas que cette hormone soit intégrée dans la voie de transduction du JA, elle serait plutôt induite de manière coordonnée avec cette dernière (Penninckx *et al.*, 1998), en tout cas pour ce qui concerne l'interaction entre *A. thaliana* et *Alternaria brassicicola*. Les voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène constituent ainsi des voies de défenses alternatives à celle de l'acide salicylique.

Les phytoalexines

Ce sont des composés antimicrobiens inductibles chez les plantes lors d'une infection ou d'un traitement avec des éliciteurs abiotiques. L'activation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des phytoalexines est la plus rapide des réactions observée chez les plantes. La plupart des phytoalexines possèdent une activité antimicrobienne *in vitro*, alors que leur rôle précis *in vivo* n'a pas encore été élucidé (Kuc *et al.*, 1995). Certaines évidences laissent à supposer un rôle dans la défense; en effet, une corrélation positive entre les quantités de phytoalexines produites et le degré de résistance envers certains pathogènes a pu être établie (Long *et al.*, 1985, Conn *et al.*, 1988). Lors de plusieurs interactions plante-pathogène, il a pu être observé que des phytoalexines s'accumulent autour du site d'infection au cours d'une infection avec un isolat avirulent mais pas lors d'une infection avec un isolat virulent (Darvill and Albersheim, 1984; Essenberg *et al.*, 1992). Ainsi, la détoxification des phytoalexines pourrait être une façon pour certains pathogènes de contourner la résistance de l'hôte.

Chez *A. thaliana*, la camalexine (3-thiazol-2'-yl-indole) est la phytoalexine prédominante qui apparaît après inoculation avec *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Tsuji *et al.*, 1992). La biosynthèse de ce composé passe par la voie du tryptophane et il a été observé que les enzymes de cette voie sont régulées de manière coordonnée avec la production de la camalexine (Zhao and Last, 1996). *In vitro*, cette phytoalexine montre un effet inhibiteur sur la croissance de *P. syringae* pv. *syringae* et *Cladosporium cucumerinum*, un pathogène du concombre (Tsuji *et al.*, 1992). La camalexine est aussi un inhibiteur de la germination des conidies d'*Alternaria brassicacea*, un autre pathogène fongique (Browne *et al.*, 1991). Ces constatations suggèrent évidemment un rôle de cette phytoalexine dans les mécanismes de résistance. D'autre part, il a pu être établi que le SA est nécessaire mais pas suffisant pour l'induction des enzymes de la biosynthèse de la camalexine (Zhao and Last, 1996). Il semblerait que la voie du JA joue aussi un rôle dans cette biosynthèse (Glazebrook, 1999).

La caractérisation cytologique de l'interaction

Lors de la mise en place du pathosystème, les observations microscopiques ont revêtu une importance particulière. En effet, après avoir observé les divers symptômes macroscopiques, il a fallu passer au niveau microscopique afin d'être capable d'illustrer les divers types de réactions survenant lors des différentes interactions. Pour cela deux colorations ont été effectuées, la première étant le bleu de Trypan qui est un colorant qui réagit avec certains éléments du cytoplasme et le colore en bleu (Keogh *et al.*, 1980). Cela donne la possibilité de visualiser, en champ clair, toutes les structures, pour autant qu'elles soient restées intactes, du pathogène ainsi que les cellules végétales mortes, que la cause de la mortalité soit *P. porri* ou non. La seconde coloration est une coloration au bleu d'aniline, qui est observable en fluorescence. Il s'agit d'un colorant qui met en évidence les β -glucanes, dont la callose est constituée (Smith and McCully, 1978). Ce composé est, entre autres, déposé contre les parois des cellules végétales, ceci afin de les renforcer et d'empêcher l'invasion du pathogène.

Ces colorations ont permis de mieux cerner les manifestations de résistance, resp. de susceptibilité au niveau cytologique chez *A. thaliana*. Elles ont aussi permis d'illustrer le cycle de vie de *P. porri* que ce dernier est capable d'effectuer lors de l'interaction compatible. Par ailleurs, l'analyse de différents mutants dans leurs réponses envers *P. porri* a aussi été effectuée par des observations microscopiques.

La caractérisation d'un facteur potentiel de reconnaissance

Lors de l'interaction entre un pathogène et son hôte, certains métabolites se retrouvent présents dans le tissu végétal alors qu'on ne les trouve pas lorsque la plante se trouve dans son état normal. Ces métabolites peuvent être des produits issus de la plante, ou bien provenir du pathogène lorsque ce dernier est en contact avec son hôte. Du côté du pathogène, on distingue deux types de facteurs, les facteurs d'avirulence et les facteurs de pathogénicité. Dans le cas des facteurs d'avirulence, comme expliqué précédemment, l'hôte pour autant qu'il possède le gène de résistance correspondant va être ainsi capable reconnaître son pathogène et d'agir en conséquence. En ce qui concerne les facteurs de pathogénicité, ils peuvent agir, par exemple, tels des toxines et car peuvent être responsables de dommages survenant dans le tissu végétal, ce qui va évidemment favoriser le processus de colonisation.

Dans le cas de l'interaction qui nous intéresse, *P. porri* doit selon toute vraisemblance sécréter des composés lorsqu'il se trouve dans le tissu. Cette hypothèse est soutenue par les manifestations morphologiques que l'on peut observer lors des interactions, qu'elles soient compatibles ou incompatibles. La dernière partie de cette thèse concerne donc la recherche d'un facteur issu de *P. porri* qui pourrait jouer un tel rôle lors de l'interaction.

CHARACTERIZATION OF AN ARABIDOPSIS-PHYTOPHTHORA PATHOSYSTEM: RESISTANCE REQUIRES A FUNCTIONAL PAD2 GENE AND IS INDEPENDENT OF SALICYLIC ACID-, ETHYLENE- AND JASMONIC ACID-SIGNALING

Arabidopsis accessions were screened with isolates of *Phytophthora porri* originally isolated from Brassicas. The described Arabidopsis-*Phytophthora* pathosystem shows the characteristics of a facultative biotrophic interaction similar to agronomically important diseases caused by *Phytophthora* species. In susceptible accessions, extensive colonization of the host tissue occurred and sexual and asexual spores were formed. In incompatible combinations the plants reacted with a hypersensitive response (HR) and the formation of papillae at the sites of attempted penetration. Defense pathway mutants such as *jar1* (jasmonic acid insensitive), *etr1* (ethylene receptor mutant) and *ein2* (ethylene insensitive) remained resistant towards *P. porri*. However, *pad2*, a mutant with reduced production of the phytoalexin camalexin, was hypersusceptible. The accumulation of salicylic acid (SA) and PR1-protein was strongly reduced in *pad2*. Surprisingly, this lack of SA accumulation does not appear to be the cause of the hypersusceptibility because interference with SA-signaling in *nahG* plants or *npr1* mutants had only a minor effect on resistance. Similarly, the complete blockage of camalexin biosynthesis in *pad3* did not cause susceptibility. Resistance of Arabidopsis against *P. porri* appears to depend on unknown defense mechanisms that are under the control of PAD2.

INTRODUCTION

Plant diseases caused by oomycetes are known for their important economical and social impact, the most prominent example being the late blight disease caused by *Phytophthora infestans* (Gregory, 1983; Bourke, 1991). Because of their fungus-like life style, the oomycetes have long been classified as fungi. However, based on their biology and phylogeny they belong to the separate kingdom Stramenopila and are believed to form a monophyletic group with the *Hyphochytriomycota* and *Labyrinthulomycota* (Barr, 1992; Dick, 1995). The nearest relatives of the oomycetes are not fungi but heterokont algae (Patterson, 1989). As in other plant diseases, race-cultivar specificity in diseases caused by oomycetes seems to be determined by gene-for-gene interactions (De Wit, 1997; Hammond-Kosack and Jones, 1997). In most cases though, evidence is based on genetic studies of the host alone. The most thoroughly investigated systems are the interactions between *Bremia lactucae* and lettuce, *Phytophthora infestans* and potato and *Phytophthora sojae* and soybean (Judelson, 1996). Many resistance genes have been genetically identified in these pathosystems (Illot *et al.*, 1989; Spielman *et al.*, 1989; Anderson and Buzzell, 1992; Buzzell and Anderson, 1992; Al-Kherb *et al.*, 1995; Crute and Pink, 1996) but none, nor any of the corresponding avirulence genes, has been isolated. Much effort has been put into the investigation of these agronomically important diseases but progress has been slowed down because of some intrinsic

attributes of the systems at hand: *Bremia* being an obligate pathogen has made the molecular analysis of this organism difficult; in the potato-*Phytophthora* system the usually tetraploid host plant hinders rapid progress; the major drawback of the soybean system are the problems encountered in soybean transformability. From a practical point of view, there is no oomycete-plant interaction available that would allow the molecular and genetic analysis of both host plant and pathogen. The interaction between *Peronospora parasitica* and Arabidopsis is the most thoroughly characterized (Holub, 1994) but it has a major drawback: *P. parasitica* is an obligate biotrophic pathogen and thus not easily amenable to molecular analysis. To overcome these limitations, we have developed an Arabidopsis-*Phytophthora* pathosystem in which both organisms are accessible to genetic analysis and transformation, thus, allowing in the future the genetic and molecular analysis of the host plant and the oomycete pathogen.

The genus *Phytophthora* consists of over 62 different species, all but 3 species are plant-pathogens. *Phytophthora* has an intermediate position within the oomycetes between the nutritionally less demanding facultative saprophytes such as *Pythium*, and the downy mildews, which are obligate biotrophic plant parasites with a strong host specialization. Since no natural infections of Arabidopsis with *Phytophthora* have been reported in the literature, we decided to test a species, *Phytophthora porri*, which is able to infect plants of the family *Brassicaceae*. *P. porri* is mainly known as a pathogen of the family of the *Amarillidaceae* (Foister, 1931). Later reports describe infections on carrots (Semb, 1971; Stelfox and Henry, 1978; Ho, 1983), cabbage (Semb, 1971; Geeson, 1976) and different ornamentals (Legge, 1951, Kouyeas, 1977). Based on the limited size of its host range, *P. porri* is placed into the group of the more highly evolved *Phytophthora* species such as *P. infestans* and *P. megasperma*. Differences in mtDNA as well as in morphology and physiology suggested that *P. porri* forms a heterogeneous group containing different species (De Cock et al., 1992). Isolates capable of infecting members of the *Brassicaceae* were not infectious on members of the *Amarillidaceae* and *vice versa* (De Cock et al., 1992). The isolates infectious on *Brassicaceae* appear to represent a different species from *P. porri* and were proposed to be renamed as *P. brassicae* (De Cock et al., 1992).

In the present publication, we report on the initial characterization of a novel Arabidopsis-*Phytophthora* pathosystem. It is shown that Arabidopsis is a true host of *P. porri* isolates. Susceptible accessions are extensively colonized and the pathogen produces asexual as well as sexual spores while resistant accessions react with a hypersensitive response and the rapid halt of pathogen ingress. The disease phenotype of different Arabidopsis defense response mutants in the resistant Col background suggests that the establishment of resistance against *Phytophthora* is not based on SA-, ethylene- or jasmonic acid-dependent mechanisms. Thus, the resistance mechanisms effective against *Phytophthora* appear to be different from the ones effective against *Peronospora parasitica* and many other pathogens (Mauch-Mani and Métraux, 1998). Interestingly, resistance against *Phytophthora* was completely abolished in the previously described *pad2* mutant (Glazebrook and Ausubel, 1994) indicating that PAD2 plays an important role in controlling the expression of resistance responses of Arabidopsis against *P. porri*.

RESULTS

P. porri has long been considered a pathogen with a narrow host range infecting plants mainly from the family *Amarillidaceae*, the best known example being leek, after which it has been named (Foister, 1931). *P. porri* had later also been described to be infectious on cabbage causing root rot (Heimann, 1994). Seven isolates of *P. porri* were tested on 15 *Arabidopsis* accessions to determine whether these plants could serve as a host. This screening resulted in the identification of susceptible and resistant hosts and some combinations with intermediate phenotype. The resistant accessions Columbia (Col-0) and Wassilewskija (Ws-0) and the susceptible accession Landsberg erecta (Ler) and Mt-0 were chosen for further analysis.

Incompatible Interaction between *Arabidopsis* and *P. porri*

P. porri can penetrate *Arabidopsis* plants over the roots (data not shown) as well as over above-ground parts. The mode of penetration is independent of the initial propagule used for infection and the initial steps are the same in resistant and susceptible plants. With both zoospores and mycelium, penetration occurred preferentially over anticlinal walls of epidermal cells (Figure 1A, B), occasionally via the stomatal opening (data not shown). Zoospores applied on leaves of *Arabidopsis* encysted, developed a germ tube reaching up to several spore diameters in length before forming an appressorium over the point of penetration (Figure 1A). A penetration hyphae then started to grow between the anticlinal walls of two epidermis cells. At this point, differences between compatible and incompatible interaction became apparent. In resistant plants, the earliest microscopically visible response was observed starting 6 hours after inoculation and consisted of the deposition of dense material, presumably of host origin, around the site of penetration as visualized for an attempted infection of Ws-0 by *P. porri* isolate HH (Figure 1B). Staining of the tissue with aniline blue revealed that these depositions contained callose, which is specifically stained by this dye (Figure 1C). Another resistance phenotype frequently encountered was the hypersensitive reaction (HR). One or several epidermal cells in the case of direct penetration through the epidermis (Figure 1D), or one or several mesophyll cells in the case of indirect penetration through a stomatal opening (data not shown), underwent a rapid cell death visualized microscopically by the retention of trypan blue in their cytoplasm. In cells adjacent to the dead ones a dense deposition of material was observed at the wall directly in contact with the dead cell (Figure 1D). Aniline blue staining revealed that the material encasing the HR cells consisted of callose (Figure 1E). Occasionally, the hyphae were able to penetrate further into the plant tissue but were soon surrounded by necrotic cells (Figure 1F). This trailing necrosis response successfully stopped further infection and became macroscopically visible as small necrotic regions on the leaves (data not shown).

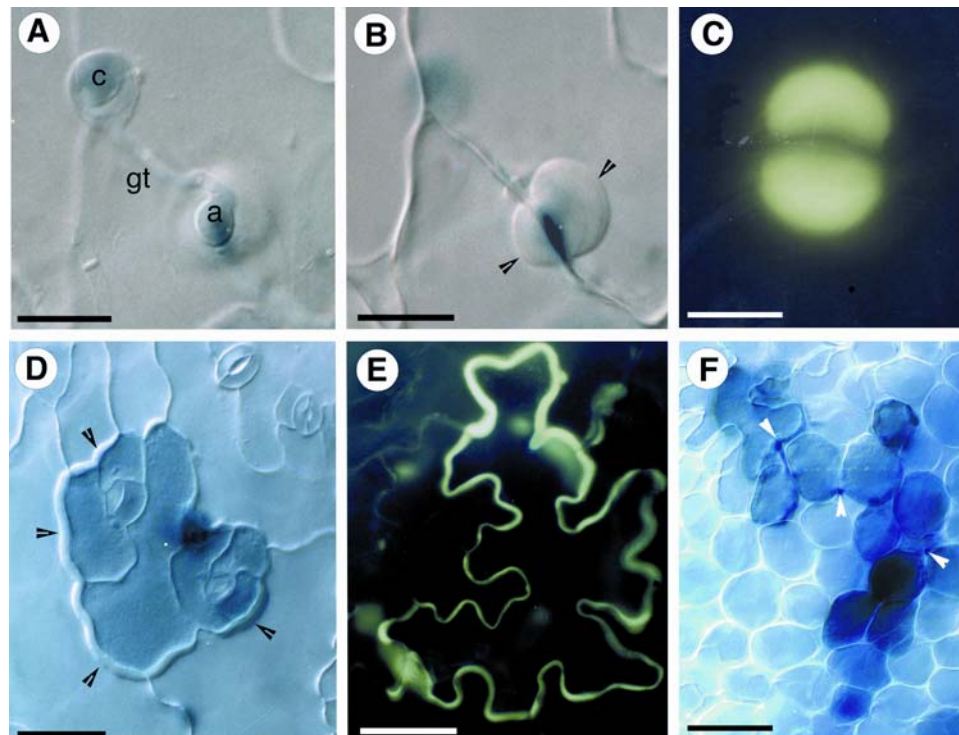


Figure 1. Cytological characterization of the incompatible interaction of *Arabidopsis* with *P. porri*. Differential interference contrast (DIC) (A, B, D, F) and fluorescence (C, E) micrographs.

A, B, D and F show lactophenol trypan-blue stained preparations, C and E were stained with decolorized aniline blue as described under Methods.

(A) A cyst (c) of *P. porri* isolate HH has formed a germ tube (gt) and an appressorium (a) on the upper epidermis of a leaf of *A. thaliana* accession Ws-0 6 hours after inoculation. The faint blue staining inside the cyst and the appressorium visualizes the cytoplasm. (bar = 10 μ m).

(B) Same as (A) focussed on the layer right below the appressorium. Arrowheads point to a heavy deposit of material called a papilla surrounding the attempted penetration site at the border of two anticlinal walls of epidermal cells. (bar = 10 μ m).

(C) Fluorescence of callose in an aniline blue-stained papilla in a leaf of *A. thaliana* accession Col-0 24 hours after infection with mycelium of *P. porri* isolate HH. (bar = 15 μ m).

(D) Hypersensitive reaction of *A. thaliana* accession Col-0 after infection with *P. porri* isolate HH 24 hours after inoculation with mycelium. The cells which have undergone a HR are stained a darker blue due to retention of trypan-blue. The penetrating hypha is out of the focal plane and only the actual point of penetration can be seen as a dark blue area between the two stomata in the HR region. In the adjacent cells, deposits of material (arrowheads) can be seen on the side where their cell walls are in contact with the HR cells. (bar = 50 μ m).

(E) Fluorescence of callose visualizing the limits of an epidermal cell of *A. thaliana* accession Col-0 which has undergone a HR after an attempted penetration by *P. porri* isolate HH. The picture was taken 24 hours after inoculation. (bar = 25 μ m).

(F) Trailing necrosis in a leaf of *A. thaliana* accession Col-0 48 hours after inoculation with mycelium of *P. porri* isolate HH. The hypersensitive cells are stained a darker blue, arrowheads point to places where the hypha is visible. (bar = 120 μ m).

Compatible Interaction between Arabidopsis and *P. porri*

In susceptible Arabidopsis accessions, penetration also occurs preferentially at the border of adjacent epidermal cells. In an initial phase, during up to 3 days depending on the Arabidopsis accession, the mycelium grew exclusively in the intercellular spaces spreading in all directions away from the penetration site (Figure 2A, B). The hyphae were fairly regular in diameter and often in close contact with the plant cells (Figure 2B). Haustoria-like protuberances into the plant cells were only rarely observed (data not shown). During this first biotrophic phase, no reactions of plant cells were visible microscopically (Figure 2B) and macroscopically (data not shown). In a later phase, the tissue was colonized by a dense network of intra- and extracellular hyphae and plant cells started retaining the trypan blue stain (Figure 2C). Macroscopically, this phase was characterized by the watersoaked and wilted appearance of the infected tissue. Under conditions of high air humidity, *P. porri* started to grow out of the stomata (Figure 2D) and the emerging sporangiophores gave rise to mostly obpyriform zoosporangia (Figure 2E). Seven days after inoculation, sexual spores, the oospores, started to appear (Figure 2F). Antheridia were either amphigynous as shown in Figure 2F or paragynous (data not shown). In the latter case, one to three antheridia per oogonium were observed. The results show that *P. porri* can extensively colonize and reproduce in susceptible accessions of Arabidopsis.

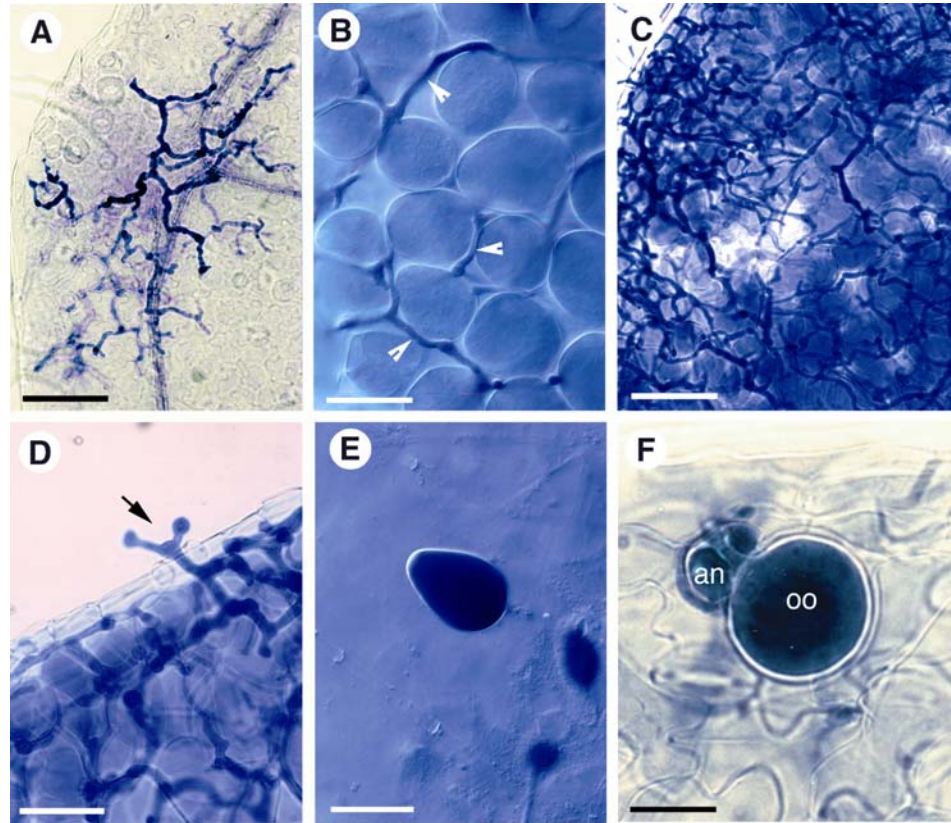


Figure 2. Cytological characterization of the compatible interaction of *Arabidopsis* with *P. porri*. Bright field (A, C, D, F) and differential interference contrast (B, E) micrographs of the compatible interaction. All the preparations were stained with lactophenol trypan-blue as described under Methods.

(A) Young colony of *P. porri* isolate HH in *A. thaliana* accession Mt-0 3 days after inoculation with zoospores. The mycelium is visible as a dark blue network ramifying inside the leaf. (bar = 150 mm).

(B) Hyphae (arrowheads) of *P. porri* isolate HH growing intercellularly in the mesophyll of a leaf of *A. thaliana* accession Ler 4 days after inoculation with mycelium. Note the absence of any necrosis in the plant cells. (bar = 60 mm).

(C) Heavy colonization as seen in a leaf of *A. thaliana* accession Mt-0 one week after inoculation with zoospores of *P. porri* isolate HH. The hyphae grow inter- and intracellularly and the plant tissue shows macroscopical symptoms of wilting. (bar = 150 mm).

(D) Sporangigenous hyphae of *P. porri* isolate II emerging through the stomatal opening in a leaf of *A. thaliana* accession Mt-0 5 days after inoculation with zoospores. (bar = 40 mm).

(E) Tear-shaped zoosporangium on the surface of a leaf of *A. thaliana* accession Ler 4 days after inoculation with mycelium of *P. porri* isolate HH. (bar = 50 mm).

(F) Oogonium and amphigynous antheridium of *P. porri* isolate D in a leaf of *A. thaliana* accession Ws-0. (bar = 25 mm).

Inheritance of Resistance

Crosses between Col-0 and Ler were performed and the progeny was tested in the F_2 generation. Resistance in the F_2 population segregated in a 3:1 ratio resistant:susceptible as tested for two independent crosses (representative data for the first F_2 population was 38 resistant and 10 susceptible, χ^2 for a 3:1 ratio = 0.235, $P > 0.05$; the second population consisted of 36 resistant and 12 susceptible plants, perfectly fitting the 3:1 segregation). Backcrosses of F_1 individuals with the susceptible parent Ler segregated in a 1:1 ratio for resistant to susceptible (13 resistant and 7 susceptible, χ^2 for a 1:1 ratio = 0.920, $P > 0.5$; 12 resistant and 8 susceptible, χ^2 for a 1:1 ratio = 0.404, $P > 0.05$). Both segregation patterns in the crosses and the backcrosses point to a single dominant gene responsible for resistance in Col-0 against isolate II of *P. porri*.

Interaction between *P. porri* and Selected Arabidopsis Defense Pathway Mutants

In order to learn more about the basis of resistance towards *Phytophthora*, several Arabidopsis mutants or transgenics with defects in defense signaling were tested for their reaction towards an attempted infection with *P. porri* isolate HH. The tested Arabidopsis mutants included: *nahG* and *npr1-1* with defects in SA signaling (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Gaffney *et al.*, 1993), the ethylene receptor mutant *etr1-1* (Bleecker *et al.*, 1988), the ethylene-insensitive mutant *ein2-1* (Guzmann and Ecker, 1990), the jasmonate insensitive mutant *jar1-1* (Staswick *et al.*, 1992) and two mutants with reduced camalexin levels: *pad2-1* and *pad3-1* (Glazebrook *et al.*, 1994; 1997). All the mutants were in the background of the resistant accession Col-0. The results of the phenotypical analysis of the mutant collection are summarized in Table 1.

Table 1. Comparison of Resistance Phenotypes of Defense Mutants of Arabidopsis towards *Phytophthora porri*

Accession/Mutant	Resistance Phenotype ^a
Ler	S
Col-0	R
<i>nahG</i>	R-
<i>npr1-1</i>	R-
<i>etr1-1</i>	R
<i>ein2-1</i>	R
<i>jar1-1</i>	R
<i>pad 2-1</i>	S+
<i>pad 3-1</i>	R-

^aR, resistant; R-, resistant with a slight shift towards susceptibility; S, susceptible; S+, hypersusceptible

Interference with ethylene or jasmonic acid signaling in *etr1*, *ein2* and *jar1*, respectively, had no effect on the resistant phenotype. Interestingly, the *jar1* mutant showed a much higher incidence of callose containing papillae (Figure 3E). This, however, had no effect on the already resistant phenotype. Prevention of SA accumulation in *nahG* or SA signaling in *npr1* had only a minor effect on the resistance towards *P. porri*. The resistance was slightly shifted towards susceptibility: *P. porri* could occasionally colonize small parts of the tissue but was soon stopped by host cell necrosis with the effect that zoosporangia and oospores were never observed in *nahG* or *npr1* plants. A similar shift towards susceptibility was observed in *pad3* which has a defect in camalexin biosynthesis and as a result is unable to synthesize camalexin (Zhou *et al.*, 1999). Thus, SA-signaling and camalexin production appear to contribute to resistance but do not seem to be part of the main defense mechanism. However, the *pad2* mutation appeared to knock out all mechanisms that are relevant for the establishment of resistance: *pad2* plants proved to be hypersusceptible towards *P. porri*. *Pad2* was even more susceptible than the susceptible accession Ler. Figures 3A-D show the results of an inoculation of *pad2* with *P. porri* isolate HH. The pathogen rapidly colonized the leaf tissue. The hyphae ramified in the intercellular spaces, and often the density of colonization was such, that several hyphae grew side by side filling the entire space between two cells (Figure 3A). Characteristic for infections in *pad2* was, that *P. porri* was able to colonize host cells intracellularly. Some host cells appeared completely filled with hyphae but there was no apparent reaction of the plant cell to this invasion (Figure 3B). Furthermore, the formation of haustoria happened more frequently compared to a normal compatible infection (Figure. 3C). The ring of cells surrounding the base of trichomes seemed especially attractive to *P. porri*. In colonized areas of leaves of *pad2* these cells were all extensively colonized (Figure. 3D). Colonization of *pad2* by *P. porri* was not apparent macroscopically until 3 days after inoculation, when the colonized tissue started to get a watersoaked appearance followed by a total collapse without visible necrosis (data not shown).

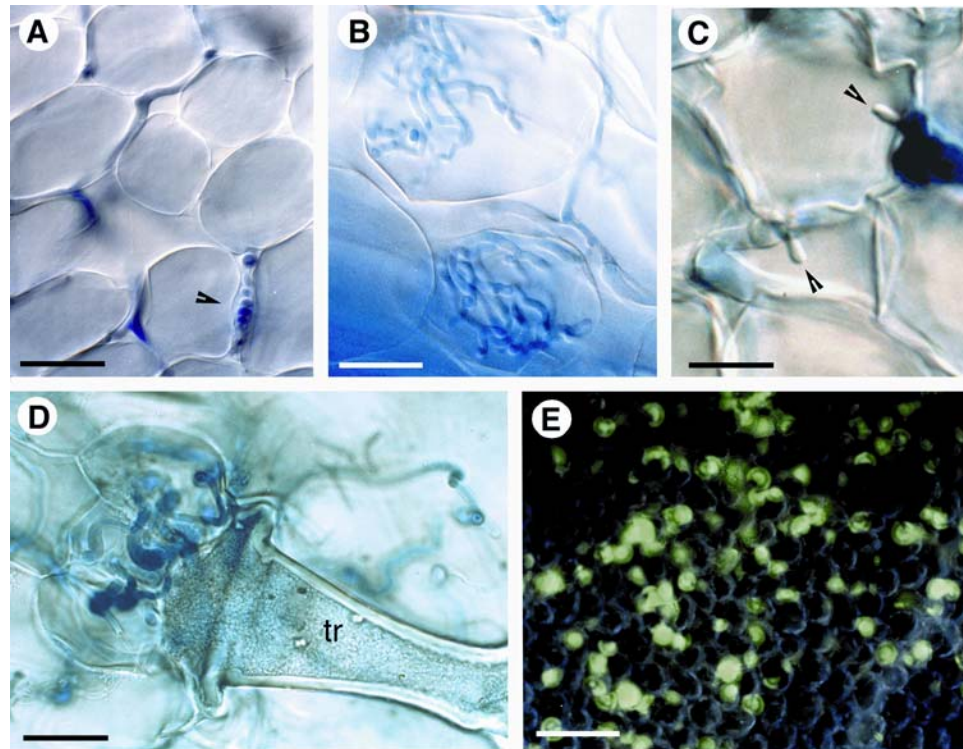


Figure 3: Cytological characterization of the interaction of *P. porri* with the hypersusceptible *pad2-1* mutant and with the jasmonate insensitive mutant *jar1-1*.

Differential interference contrast (DIC) (A, B, C), bright field (D) and fluorescence (E) micrographs. A, B, C, D show lactophenol trypan-blue stained preparations and (E) was stained with decolorized aniline blue as described under Materials.

(A) Intercellularly growing mycelium of *P. porri* isolate HH in the mesophyll of the *pad2* mutant.

Note the locally high concentration of hyphae (arrowhead) without visible reaction of the host cells.

(bar = 60 μm).

(B) Extremely dense intracellular colonization of mesophyll cells of the *A. thaliana pad2* mutant with hyphae of *P. porri* isolate HH. Note that no visible reaction of the host cell can be detected.

(bar = 40 μm).

(C) Intracellular fingershaped haustoria (arrowheads) of *P. porri* isolate HH in mesophyll cells of the *pad2* mutant.

(bar = 20 μm).

(D) Preferential colonization of the cells surrounding the base of trichomes (tr) by *P. porri* isolate HH in the *pad2* mutant. (bar = 40 μm).

(E) Low magnification picture of part of a leaf of *jar1* after infection with mycelium of *P. porri* isolate HH. All the bright green spots are papillae stained for callose at attempted penetration points of hyphae in the leaf. (bar = 150 μm).

Analysis of Marker Gene Expression in Different Defense Mutants

The expression of PR-protein 1 (PR-1) was used as a marker of SA-dependent defense responses (Ward *et al.* 1991) and the expression of a plant defensin PDF1.2 served as a marker of ethylene and jasmonic acid dependent defense gene induction (Penninckx *et al.*, 1998). As shown in Figure 4, the inoculation of the resistant accession Col-0 with *P. porri* isolate HH lead within 24h to an increased expression of *PR-1* and *PDF1.2*. *PR-1* gene expression was completely blocked in *nahG* plants and partially blocked in the *npr1* mutant, while the *etr1* and *jar1* mutations showed no effect on *PR-1*-expression compared to wild type. *PR-1* expression was only slightly down-regulated in the *pad3* mutant but was completely blocked in the *pad2* mutant. *PDF1.2* expression was strongly down regulated in inoculated *etr1* and *jar1* mutants but remained unaffected in the SA signaling mutants and the two tested *pad* mutants. Despite the lack of *PDF1.2* expression, *etr1* and *jar1* both showed a resistant phenotype thus suggesting that *PDF1.2* accumulation does not contribute much to resistance against *P. porri*.

Figure 4 includes a comparison of the *PR-1* expression pattern in Col-0 and the collection of mutant plants infected with *P. porri* isolate HH or *Peronospora parasitica* isolate EMWA. The profile of *PR-1* expression induced in both pathosystems is nearly identical. *PR-1* expression is at least partially blocked in *nahG*, *npr1* and *pad2* but remains unaffected in *etr1* and *jar1*. However, the pattern of resistance phenotypes is completely different in the two pathosystems as indicated at the top and bottom, respectively, of Figure 4. *NahG* and *npr1* remain resistant against *P. porri* but become susceptible towards *P. parasitica*. In contrast, *pad2* becomes susceptible towards *P. porri* but remains resistant against *P. parasitica*. Thus, the resistance mechanisms effective against *P. porri* appear to be fundamentally different from the mechanisms that are effective against *P. parasitica*.

Determination of SA- and Camalexin Levels

PR-1 expression was completely blocked in *pad2*. This *nahG*-like phenotype suggested that the *pad2* mutation might have a negative effect on SA accumulation. To test this hypothesis, the effect of *P. porri* inoculation on SA levels was measured in Col-0, Ler, *nahG* and *pad2*. The results of the SA measurement 24h post inoculation are shown in Figure 5A. Within 24h following inoculation the level of free SA increased about 3 times in the resistant Col-0 and more than 10 times in the susceptible Ler. The SA levels of *nahG* plants were very low in control plants and did hardly increase following inoculation with *P. porri*. A similar SA-minus phenotype was found for *pad2*. Even uninfected *pad2* plants had a 3 times lower SA content than Col-0 plants. This value did only slightly increase following inoculation and remained lower than the SA content in untreated Col-0. The pattern of SA levels 36h and 48h post inoculation remained qualitatively unchanged from the one shown in Figure 5 (data not shown). *Pad2* clearly shows a *nahG*-like SA-minus phenotype. The values for conjugated SA for Col-0, *nahG* and *pad2* 24h post inoculation were in the range of control plants (500-800 ng/g FW) indicating that the lack of accumulation of free SA was not caused by an increased SA-conjugation rate. The level of conjugated SA was raised to 1800ng/g FW in the susceptible Ler (data not shown).

Because *pad2* was originally described as a camalexin mutant (Glazebrook and Ausubel, 1994), its ability to produce camalexin was tested 24h post inoculation (Figure 5B). Inoculation of Col-0 with *P.*

porri isolate HH lead to a 60-fold increase in the level of camalexin compared to uninoculated control plants. Very similar results were found for *nahG* plants while the levels of camalexin in the susceptible accession Ler were slightly higher. The increase in camalexin production appears to be independent of SA accumulation and the occurrence of HR. In contrast to Col-0 the level of camalexin in uninoculated *pad2* plants was found to be below the limit of detection. Camalexin accumulation was reduced in inoculated *pad2* plants to about 40% of the values found in Col-0.

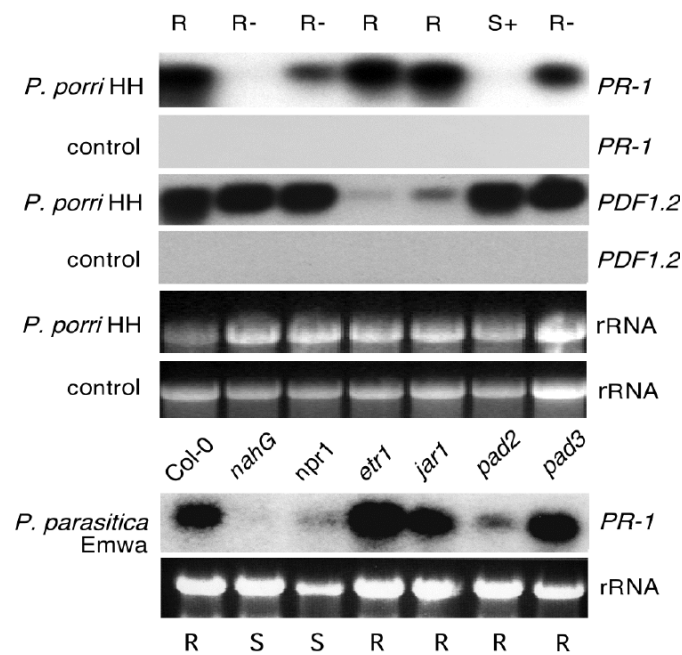


Figure 4. *PR-1* and *PDF1.2* marker gene expression in different Arabidopsis genotypes in response to inoculation with *P. porri*. *PR-1* and *PDF1.2* gene specific probes were used for RNA gel blot analysis of the indicated genotypes (Col-0, *nahG*, *npr1*, *etr1*, *jar1*, *pad2*, *pad3*). Ethidium bromide staining of the gel was used as an estimation of equal sample loading (rRNA). Plants were either uninoculated (control), inoculated with *P. porri* isolate HH or *P. parasitica* isolate EMWA. RNA was extracted 24h post inoculation. Resistance phenotypes of the respective interactions are indicated for *P. porri* in the top line and for *P. parasitica* in the bottom line, respectively. R, R-, S and S+ are explained in the legend to Table 1.

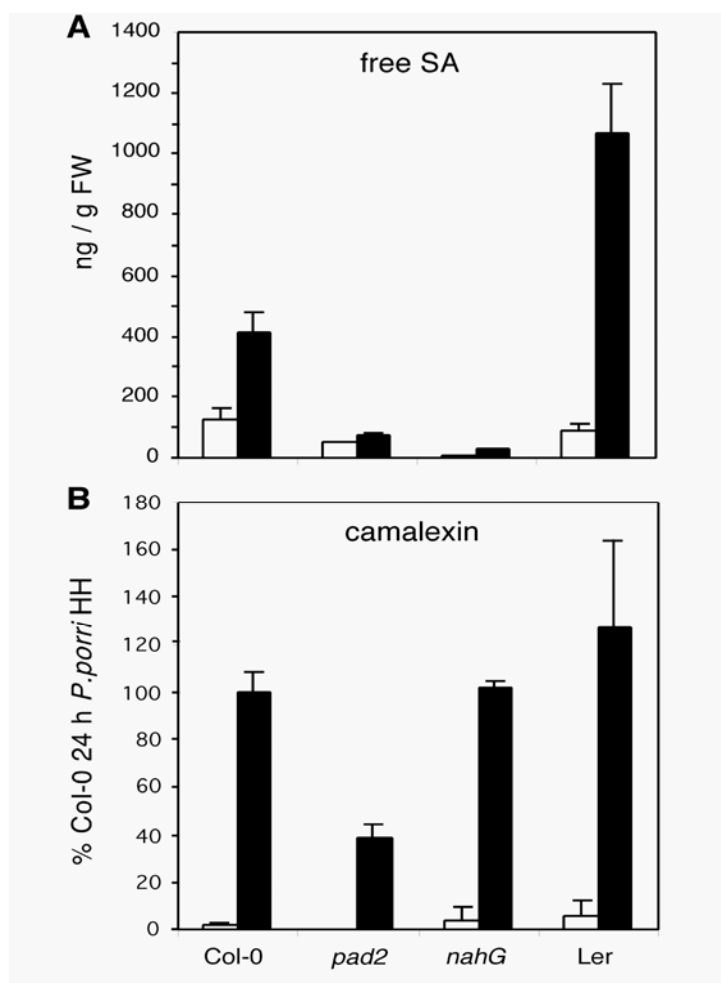


Figure 5. Accumulation of free SA and camalexin in Col-0, *pad2*, *nahG* and Ler after inoculation with *P. porri* isolate HH. Five weeks old plants were inoculated with *P. porri* isolate HH and leaves were harvested 24h later. The values represent the average of two independent samples \pm SE. **(A)** Levels of free salicylic acid (SA). **(B)** Camalexin levels. Because of the lack of a pure standard, values are expressed in relation to the value of Col-0 24h post inoculation.

DISCUSSION

The Arabidopsis-*Phytophthora* Pathosystem

An experimental system for the analysis of the interaction of Arabidopsis with the phytopathogenic oomycete *Phytophthora porri* was established. Fifteen accessions of Arabidopsis were screened for their reaction to 7 isolates of *P. porri* known to be pathogenic on family members of the *Brassicaceae*. Accession-isolate combinations were identified that result in either complete resistance or in complete susceptibility. Accessions susceptible to a given isolate of *P. porri* are completely colonized by *P. porri* within a few days (Figure 2). In the initial phase, the pathogen developed in the intercellular space and no host reaction was observed. In a later phase, the host cells were macerated, oospores formed inside the colonized tissues and hyphae grew out of the stomata to give rise to zoospores. Thus, *P. porri* can complete its whole life cycle in a susceptible host and Arabidopsis can therefore be considered a true host of this pathogen. The compatible interaction showed all the characteristics of a facultative biotrophic interaction very similar to *P. infestans* on potato and other agronomically important diseases

caused by *Phytophthora* (Erwin and Ribeiro, 1996). In incompatible host-pathogen combinations different degrees of resistance were observed (Figure 1). The plant reacted either with a HR comprising one to a few cells or the pathogen was able to grow to some extent into the tissue triggering a HR visible macroscopically as a necrotic fleck. The formation of callose-containing papillae was frequently observed at the site of penetration. Interestingly, callose production and cell wall appositions were also found in the cells adjacent to cells undergoing HR. These extensive appositions are presumably produced by the neighbouring cells and were restricted to walls with direct contact to the dying cells. It is not known how this directional callose deposition process is regulated.

The observation of a HR in resistant hosts suggested that the interaction of some combinations of *Arabidopsis* accessions and *P. porri* isolates might follow a gene-for-gene type of interaction. The segregation analysis of the phenotypes of the F_2 progeny of crosses between the resistant accession Col-0 and the susceptible accession Ler as well as backcrosses of F_1 progeny with the susceptible accession indicated that resistance is inherited as a single dominant mendelian trait. The successful infection of plants by *Phytophthora* strongly depends on environmental conditions. This is also the case in the *Arabidopsis* system. In order to generate reproducible results it is necessary to strictly control the environmental conditions (see Methods). The strong dependence on environmental conditions made it difficult to screen larger numbers of inoculated plants. The tentative scoring of intermediate interactions lead to an increased uncertainty. Presumably because of these practical problems in upscaling, our first attempt to map the putative resistance gene in Col-0 was not successful.

The major advantage of the novel *Phytophthora*-pathosystem is its use of *Arabidopsis* as a host. The availability of complete sequence information, the ease of mutational analysis, the extensive mutant collection and the possibility to use microarrays for gene expression analysis is expected to lead to an acceleration in data generation. *Phytophthora* is an agronomically much more important pathogen than the obligate biotrophic *Peronospora parasitica* which is frequently used as a model oomycete pathogen of *Arabidopsis* (Koch and Slusarenko, 1990; Holub *et al.*, 1994). *Phytophthora* has the advantage that it can be cultured *in vitro*. Both sexual and asexual spores can be produced *in vitro* by *P. porri* (data not shown). *Phytophthora* is therefore much more accessible to molecular analysis. *Phytophthora* species including *P. porri* (Si-Ammour *et al.*, unpublished results) are transformable (Judelson, 1991). The genome size of *P. porri* is relatively small (Si-Ammour *et al.*, unpublished results) compared to *P. infestans* (Tooley and Therrien, 1987).

The major disadvantage of the novel system is based on an inherent property of the oomycetes. Oomycetes are diploid during most phases of their life cycle (Brasier and Sansome, 1975; Boccas, 1976). The only haploid stages occur in the gametangia formed immediately prior to fertilization. This fact considerably complicates the genetic analysis of *Phytophthora* since the phenotype of recessive mutations can only be discovered after selfing in the F_2 generation. This step would be very difficult if not impossible to achieve with the heterothallic *P. infestans*. Most *Phytophthora* species are heterothallic and require strains of different mating types for genetic crosses (Erwin *et al.*, 1983). In contrast, *P. porri*, like *P. sojae*, is a homothallic species forming oospores by selfing (Erwin and Ribeiro, 1996). This is a clear advantage for genetic analysis since recessive lethal mutations should be rare and the strains are mostly pure-breeding and therefore homozygous. The fact that *P. porri* is homothallic opens the possibility of a mutational analysis of the pathogen. On the other hand segregation analysis is more difficult in

homothallic species. Crossing of different homothallic strains of oomycetes has been described (Bhat and Schmitthenner, 1993; Francis and St. Clair, 1993; Whisson *et al.*, 1994; Tyler *et al.*, 1995) and F_1 hybrids are easily differentiated from selfed progeny by using parental strains carrying single dominant selectable markers conferring resistance to metalaxyl or p-fluorophenylalanine (Bhat and Schmitthenner, 1993).

Resistance of Arabidopsis against *P. porri* does not depend on SA-, ethylene- or jasmonate-dependent signaling pathways

Inoculation of Arabidopsis with *P. porri* triggered the accumulation of the jasmonic acid and ethylene-dependent marker gene *PDF1.2* and of the SA-dependent marker gene *PR-1* (Figure 4). Although both of these major defense signaling pathways are activated they do not seem to be involved in the regulation of the defense mechanisms that are effective against *P. porri* (Table 1). Interference with ethylene or jasmonic acid signaling in the *etr1*, *ein2* and *jar1* mutants, respectively, had no effect on the resistance phenotype. The *jar1* mutant showed an increased formation of papillae (Figure 3) suggesting a negative correlation between jasmonic acid signaling and the formation of papillae. Increased papillae formation had no effect on the disease phenotype in the resistant genetic background of Col-0. A *jar1* mutant in the susceptible Ler background is not available to test the effect of increased papillae formation on disease susceptibility. In contrast to our results with *Phytophthora*, it was shown that resistance of Arabidopsis towards other oomycete pathogens, *Pythium irregulare* and *Pythium mastophorum*, respectively, depends on functional jasmonate signaling (Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.* 1998).

Surprisingly, blockage of SA accumulation had only a minor effect on the resistance of Arabidopsis towards *P. porri*. The trailing necrosis observed in these interactions was still effective in preventing colonization. Resistance in *nahG* and *npr1* plants is only slightly shifted towards susceptibility indicating a minor contribution of the SA-signaling pathway to resistance. The prevention of the accumulation of SA in *nahG* transgenic plants had a stronger effect on *PR-1* gene expression than in the SA signaling mutant *npr1* (Figure 4). Similar SA-dependent but partially NPR1-independent regulation of *PR* gene expression has been observed in other pathosystems (Reuber *et al.*, 1998; Rate *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000).

A dramatic effect on disease resistance was observed in the *pad2* mutant which was originally isolated as a camalexin mutant (Glazebrook and Ausubel, 1994). *Pad2* was found to be hypersusceptible towards *P. porri*. The pathogen could extensively colonize the plant tissue without causing any of the defense responses observed in the resistant wild type such as HR and papillae formation (Figure 3). No host response was observed with the exception of an increased *PDF1.2* expression (Figure 4). The results of Figure 5 show that *pad2* behaves as a SA-accumulation mutant similar to *nahG* plants and the *sid* mutants (Gaffney *et al.*, 1993; Nawrath and Métraux, 1999). It is unclear at what level in the signaling cascade *pad2* is interfering with SA accumulation. The SA deficient phenotype of *pad2* was also observed in uninoculated plants indicating that the effect of PAD2 is not limited to *Phytophthora* specific signaling events. The *pad2* mutant is blocked in SA accumulation and *PR-1* expression and becomes hypersusceptible towards *P. porri*. However, the lack of SA accumulation and *PR-1* expression in *pad2* seems not to be the cause of the observed hypersusceptibility. A similar block in SA-accumulation in

nahG plants has only a limited effect on disease resistance. The susceptibility towards *P. porri* in *pad2* seems not to be caused by the lack of SA dependent defense responses. In agreement with our conclusion, it was not possible to increase resistance in Ler or *pad2* (data not shown) by prior application of the SA-analog benzothiadiazole (Görlach *et al.*, 1996). The *pad2* mutation appears to affect SA-, ethylene- and jasmonic acid-independent defense mechanisms which are of crucial importance for the establishment of resistance against *P. porri*. These unknown defense mechanisms only partially include the accumulation of camalexin. The effect of the *pad2* mutation on camalexin production (Figure 5B) is much weaker than in the camalexin biosynthesis mutant *pad3* which is incapable of producing camalexin (Zhou *et al.* 1999). However, the complete lack of camalexin production in *pad3* has only a marginal effect on disease resistance towards *P. porri* (Table1). Thus, camalexin production appears to contribute to resistance but does not seem to be part of the main defense mechanisms. It has been shown that camalexin accumulation is not important for defense against avirulent *Pseudomonas syringae* pathovars (Glazebrook and Ausubel, 1994) but appears to play a role in resistance towards *Alternaria brassicicola* (Thomma *et al.*, 1999). In the *Phytophthora* pathosystem, camalexin production seems to be independent of SA content (Figure 5). In contrast, camalexin production was strongly reduced in *nahG* plants inoculated with virulent or avirulent bacteria (Zhao and Last, 1996; Zhou *et al.*, 1998; Nawrath and Métraux, 1999). However, it was not reduced in *sid1* and *sid2* which both have a defect in SA accumulation (Nawrath and Métraux, 1999).

Both SA-dependent defense responses and camalexin accumulation appear to contribute to the resistance of Arabidopsis towards *Phytophthora*. An alternative explanation to the above hypothesized PAD2-controlled unknown defense mechanism, which is not excluded by our results, is that the combined effect of the reduced SA- and camalexin accumulation causes the hypersusceptibility of *pad2*. However, it appears unlikely that the weak disease resistance phenotypes of *nahG* and *pad3* in combination would give rise to the hypersusceptibility of *pad2*. This alternative hypothesis could be tested in *pad3/nahG* and *pad3/sid2* double mutants.

Comparison of the *P. porri* system with the *P. parasitica* system

The *PR-1* and *PDF1.2* gene expression patterns induced by *P. porri* and *P. parasitica* were nearly identical in the different mutants (Figure 4). However, the pattern of resistance phenotypes is different in the two oomycete pathosystems. Interference with SA-signaling in *nahG* and *npr1* leads to susceptibility towards the avirulent *P. parasitica* isolate EMWA but has only a very minor effect on the resistance against *P. porri*. Recent evidence suggests that there is some unexpected variety in defense signaling in the *P. parasitica* system (McDowell *et al.*, 2000). Resistance to some avirulent strains of *P. parasitica* was shown to be also SA-independent. The *pad2* mutant becomes susceptible only towards *P. porri* but remains resistant against *P. parasitica*. The effect of the *pad2* mutation on resistance against several avirulent *P. parasitica* isolates has been tested before (Glazebrook *et al.*, 1997). In agreement with our results no significant shift towards susceptibility was observed in plants inoculated with 4 out of 5 avirulent isolates of *P. parasitica*. Thus, resistance against *P. porri* appears to depend on PAD2-controlled

defense mechanisms that are different from the mechanisms effective against *P. parasitica*. A third difference between the two oomycete pathosystems is that the prevention of camalexin biosynthesis in *pad3* had no effect on the resistance against most *P. parasitica* isolates (Glazebrook *et al.*, 1997) but causes a slight shift towards susceptibility against *P. porri*.

In conclusion, an *Arabidopsis-Phytophthora* pathosystem was established that allows the simultaneous molecular and genetic analysis of host and oomycete pathogen. The novel pathosystem shows the characteristics of a facultative biotrophic interaction very similar to agronomically important diseases caused by other *Phytophthora* species. Our initial results demonstrate that effective disease resistance of *Arabidopsis* against *Phytophthora* is dependent on defense mechanisms that are controlled by the PAD2 gene product. PAD2 has not yet been cloned and its function in resistance is not well described. In the *Arabidopsis-Phytophthora* system, PAD2 appears to control SA- and camalexin production. However, our results demonstrate that, in contrast to most other pathosystems, SA-regulated defense responses play only a minor role in resistance against *Phytophthora*. Resistance of *Arabidopsis* against *P. porri* appears to depend on unknown SA-independent mechanisms that are under the control of PAD2.

METHODS

Phytophthora porri Isolates and *in vitro* Culture Conditions

The *Phytophthora porri* isolates HH and II were kindly supplied by Francine Govers (University of Wageningen) and were routinely grown on V8 juice (Campbell Soups) agar (Erwin and Ribeiro, 1996) in the dark at 18 °C. Zoospores were produced by placing 15 plugs (Ø 5 mm) of mycelium in 10 ml of clarified (by centrifugation, 20 min, 4000 rpm) V8 juice (10%) in the dark at 16°C for 2-3 days. By that time, the V8 juice was replaced by the Schmidthenner Solution (Erwin et Ribeiro, 1996). After 3-4 days of incubation the mineral solution was replaced by cold sterile water and the zoospores were released within 2-4 hours into the water. For short-term storage up to several month, the *Phytophthora* strains were cultivated on potato carrot agar (Johnston and Booth, 1968) and kept at 4°C. Long-term storage was accomplished by immersing agar plugs with mycelium in 10% glycerol followed by storage in liquid nitrogen (Smith, 1982).

Plant material

Arabidopsis thaliana seeds accession Columbia (Col-0), Wassilewskija (Ws-0) and Landsberg erecta (Ler) were purchased from Lehle Seeds (Round Rock, TX). Mt-0 was obtained from the AIS-collection. The mutants *pad2-1* and *pad3-1* were supplied by J. Glazebrook (Novartis, NADII, San Diego) and *jar1-1*, *npr1-1*, *etr1-1* and *ein2-1* seeds were obtained from X. Dong (Duke University, Durham, NY), P. E. Staswick (University of Nebraska, Lincoln, NE) and the Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, respectively. The *nahG* line was provided by J. Ryals (Novartis, Research Triangle Park, NC). After sowing on a mixture of commercial potting soil and perlite (4:1), the seeds were stratified for 3 days at 4°C in the dark before being transferred to a growth chamber with a photoperiod of 10 hours day at 18°C and 14 hours night at 16°C.

Infection of plants with *P. porri*

Three to 4 weeks-old rosette leaves were inoculated with plugs of young mycelium placed upside-down on the leaves. For zoospores inoculations, droplets of a zoospore suspension (10^4 spores mL⁻¹) were placed on the leaves. For the first 14 hours the lids of the trays were kept tightly shut in order to ensure 100 % relative humidity. Subsequently, a relative humidity of about 70% was kept in the trays. These conditions were maintained for the whole period of the experiments.

Inoculation with *Peronospora parasitica*

Isolate EMWA of *P. parasitica* was transferred weekly onto new Arabidopsis plants accession Wassilewskija (Ws-0) and infections were performed with a spore suspension of 10^4 conidia mL⁻¹ as described (Mauch-Mani and Slusarenko, 1994).

Microscopy

Leaves were harvested at different time-points and stained with lactophenol-trypan blue to visualize fungal structures and dead plant cells in the tissue (Keogh *et al.*, 1980) or with decolorized aniline blue (Smith and McCully, 1978) for visualization of callose. The stained material was viewed using a Leica DMR microscope equipped with bright field, differential interference contrast (DIC) and UV optics.

RNA Gel Blot Analysis

Plant material was quick-frozen in liquid nitrogen, pulverized and kept at - 80°C before further processing. RNA was extracted as described (Zimmerli *et al.*, 2000). Ten micrograms of RNA were separated on a formaldehyde/agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). The membrane was probed with ³²P-radiolabeled cDNA (RadPrime DNA Labeling System, Life Technologies, Merelbeke, B) of *PR-1* (Uknes *et al.*, 1992) and *PDF1.2* (Penninckx *et al.*, 1999).

Measurement of Salicylic Acid and Camalexin

The measurement of SA and camalexin was performed as described (Meuwly and Métraux 1993; Nawrath and Métraux, 1999).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Francine Govers, University of Wageningen, The Netherlands, for supplying *Phytophthora porri* isolates, Dr. Jane Glazebrook, NADII, San Diego, for the *pad* mutants, Dr. Xinnian Dong, Duke University, Durham, NY, USA, for the *npr1* seeds, Dr. John Ryals, Novartis Research Triangle Park, NC, USA, for the *nahG* seeds, Dr. P.E. Staswick, University of Nebraska, Lincoln, NE, USA, for the *jar1* mutant. We are grateful to Dr. A Buchala for his help in SA- and camalexin measurements and to G. Rigoli for excellent technical assistance. We thank Dr. G. Jakob for critical reading of the manuscript. This work was supported by grant No. 31-50519 of the Swiss National Science Foundation.

LES MECANISMES DE RESISTANCE IMPLIQUES DANS L'INTERACTION *A. THALIANA*-*P. PORRI* NECESSITENT DES GENES *NDR1* ET *EDS1* FONCTIONNELS ET L'ETAT RESISTANT NE PEUT ETRE INDUIT NI PAR UN TRAITEMENT AU BTH NI PAR UNE BACTERIE AVIRULENTE.

Les expériences précédentes ont permis de démontrer que les réactions d'incompatibilité observables chez *A. thaliana*, lorsque cette dernière est infectée par *P. porri*, semblent être indépendantes des principales voies de défense présentes chez cette petite Brassicacée. Par ailleurs, le déclenchement préalable d'une réaction systémique acquise (SAR) chez l'écotype Ler et le mutant *pad2* n'a pas permis d'obtenir une protection subséquente envers *P. porri*, ce qui conforte l'affirmation de l'indépendance de la voie de l'acide salicylique dans les mécanismes de défense envers cet Oomycète. L'analyse cytologique, biochimique et moléculaire de trois autres mutants, à savoir *ndr 1-1* (non-race-specific disease resistance), *eds 1.1* (enhanced disease susceptibility) et *ein 2.1* (ethylene insensitivity) a permis de confirmer les affirmations ci-dessus. En outre, les manifestations de susceptibilité observables chez *ndr 1-1* et *eds 1.1* ainsi que le fait que ces deux mutants sont mutuellement exclusifs laisse à penser que la reconnaissance envers *P. porri* ne s'effectue pas uniquement par l'intermédiaire d'un seul gène de résistance. Cette constatation tendrait à expliquer pourquoi la cartographie du gène de résistance chez l'écotype Col-0 n'a pas donné un résultat plausible.

INTRODUCTION

La capacité ou non d'enclencher les mécanismes de résistance envers un pathogène donné est souvent déterminée par l'arrière-fond génétique des plantes (Keen, 1990). Dans la plupart des cas, ceci est accompagné par une mort cellulaire localisée au site d'inoculation, qualifiée de réaction hypersensible (HR), ainsi que par une série d'événements liés à la défense, comme par exemple un stress oxydatif, un renforcement local des parois cellulaires ainsi qu'une accumulation de protéines liées à la pathogenèse (Lamb, 1994). Dans le pathosystème *A. thaliana*-*P. porri*, les manifestations de défense, dont fait partie la HR, sont typiquement celles d'une interaction dite "gène pour gène" (Flor, 1971), ce qui indique que la reconnaissance envers *P. porri* doit s'opérer via un mécanisme impliquant la participation d'un gène de résistance. Une analyse génétique effectuée précédemment (chapitre 2) laisse entrevoir la présence d'un gène de résistance, se trouvant dans l'arrière-fond génétique de Col-0 et qui serait hérité de manière dominante. Ceci consitue ainsi le point de départ de la cartographie de ce gène grâce à la disponibilité de lignées recombinantes (Recombinant Inbred lines) issues d'un croisement entre Ler et Col-0 qui sont respectivement les écotypes susceptibles et résistants envers *P. porri*.

De manière analogue, il devient aussi intéressant d'étudier la réaction de plantes empêchées dans les voies de reconnaissance qui sont sous le contrôle de différents gènes de résistance. Pour cela, deux mutants, *ndr 1-1* (non-race-specific disease resistance) et *eds 1.1* (enhanced disease

susceptibility) affectés dans les mécanismes situés en aval de la reconnaissance R-avr envers des procaryotes et eucaryotes ont été analysés. En effet, la mutation affectant *NDR1* supprime la résistance envers *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 portant les gènes d'avirulence *avrB*, *avrRpm1*, *avrRpt2* et *avrPph3* ainsi qu'envers certains isolats de *Peronospora parasitica* (Century *et al.*, 1995) alors que celle affectant *EDS1*, confère une susceptibilité envers d'autres isolats de *P. syringae* et de *P. parasitica* (Parker *et al.*, 1996). Ces mutations laissent entrevoir l'existence de différentes voies de défense répondant à différents types de pathogènes et qui seraient par conséquent sous le contrôle de différents gènes de résistance. Il existe à l'heure actuelle plusieurs types de gènes de résistance qui ont été regroupés en différentes classes selon leurs caractéristiques structurales (Staskawicz *et al.*, 1995; Martin, 1999). Le clonage de *NDR1* a révélé une homologie avec une protéine possédant deux domaines transmembranaires putatifs (Century *et al.*, 1998) et qui est impliquée dans les voies de transduction des gènes de résistance appartenant à la classe LZ-NBS-LRR (Glazebrook, 1999). *EDS1*, qui a aussi été cloné, présente des homologies avec une lipase eucaryote (Falk *et al.*, 1999) et les gènes de résistance requérant *EDS1* appartiennent, quant à eux, à la classe TIR-NBS-LRR (Glazebrook, 1999). Ces voies de signalisation différentes sont par ailleurs considérées comme étant mutuellement exclusives (Aarts *et al.*, 1998).

Les expériences regroupées sous ce chapitre concernent d'une part la suite de la caractérisation biochimique des interactions entre Col-0, *pad2* et Ler envers *P. porri* et d'autre part, une analyse cytologique, biochimique et moléculaire de trois autres mutants, à savoir *ndr 1-1*, *eds 1.1* et *ein 2.1* (éthylène insensitivity). Ce dernier est un mutant de la voie de l'éthylène, situé en aval de *etr 1-1*, qui est empêché dans toutes les réponses envers ce gaz (Guzman and Ecker, 1990). *EIN2* présente des homologies avec les transporteurs de ions métalliques et pourrait être impliqué dans d'autres voies de transduction que celle de l'éthylène (Alonso *et al.*, 1999). L'expérience qui clôt ce chapitre traite quant à elle d'une tentative de cartographie du gène de résistance putatif chez *A. thaliana*.

RESULTATS

Un traitement abiotique ou biotique ne permet pas d'induire une résistance face à *P. porri*

Comme l'écotype Ler et le mutant *pad2* sont susceptibles envers l'isolat HH de *P. porri*, il était intéressant d'observer quelles sont les réactions de ces derniers s'ils subissent un traitement visant à induire une résistance systémique acquise (SAR) avant d'être inoculés par *P. porri*. Pour cela deux traitements ont été appliqués, un traitement abiotique impliquant le BTH (acide benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothionique-S-methylester), qui est un inducteur de résistance déjà utilisé dans d'autres pathosystèmes (Görlach *et al.*, 1996), ainsi qu'un traitement biotique impliquant une bactérie avirulente, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *AvrRpt2* (Crute *et al.*, 1994). Ces deux traitements résultent en l'établissement d'une résistance systémique acquise (SAR) avec, entre autres phénomènes, l'expression du gène *PR-1* (Crute *et al.*, 1994).

Ler et *pad2* ont donc été prétraités puis inoculés avec l'isolat HH de *P. porri* (figure 1). En ce qui concerne les symptômes macroscopiques, au bout de 5 jours il devient évident qu'il n'y a aucune différence entre les plantes prétraitées et celles qui ne l'ont pas été. Dans les deux cas, les feuilles

infectées présentent le même degré de susceptibilité (figure 1B). En marge des symptômes macroscopiques, deux prélèvements ont été effectués, l'un juste avant l'inoculation, (temps 0), ainsi qu'un second 36 heures après le début de l'infection. Par northern Blot (figure 1A), on observe que pour Ler, les plantes prétraitées expriment *PR-1* avant le début de l'inoculation tandis que chez les plantes non prétraitées aucune induction au temps 0 est détectable. Chez ces dernières, on observe l'induction de ce gène après 36 heures ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment (chapitre 2). En ce qui concerne *pad2*, les plantes prétraitées présentent quasiment aucune induction de *PR-1* aux temps 0 et 36, tant pour le traitement abiotique que biotique. Cette constatation apporte une preuve supplémentaire que *pad2* est un mutant de la voie de l'acide salicylique d'une part et d'autre part, que cette voie n'est pas primordiale dans les mécanismes de défense car que cette dernière soit ou non induite, Ler et *pad2* restent susceptibles envers *P. porri*. Les deux types d'expériences ont été renouvelés deux fois et des résultats analogues ont été obtenus.

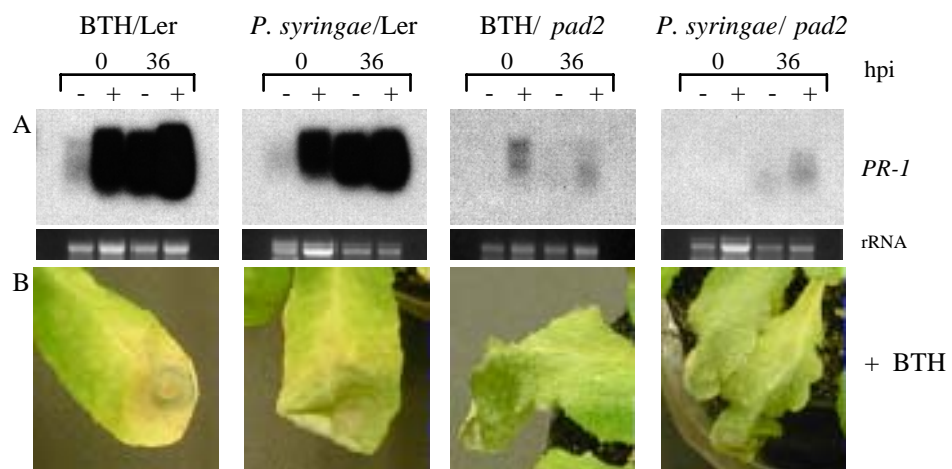


Figure 1. Etude des effets de l'établissement préalable d'une réaction systémique acquise (SAR) sur l'inoculation de l'écotype Ler et du mutant *pad2* par l'isolat HH de *P. porri*. (A) Northern Blots illustrant l'expression du gène *PR-1*, 0 et 36 heures après le début de l'infection. - = plantes non traitées, + = plantes prétraitées. Le bromure d'éthidium (rRNA) sert de contrôle pour le chargement du gel. (B) Manifestations morphologiques chez Ler et *pad2*, 5 jours après l'inoculation. Les symptômes de susceptibilité sont analogues tant chez les plantes prétraitées (+ BTH) que chez les contrôles (non illustrés).

L'acide salicylique (SA), la camalexine, l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (C₂H₄) ne sont pas primordiaux pour la résistance envers *P. porri*

Le chapitre 2 présente le résultat des mesures de SA et de camalexine effectuées 24 heures après le début de l'infection de Col-0, Ler et *pad2* avec l'isolat HH de *P. porri*. Dans cette partie, les mesures de SA, de camalexine, de JA et de C₂H₄ effectuées au cours d'une inoculation avec l'isolat HH sont comparées. Les quatre types de mesures sont réunies sous la figure 2.

Les mesures de SA ont été effectuées au cours de 5 expériences indépendantes et les prélèvements se sont effectués 0, 24, 48 et 72 heures après le début de l'inoculation. Le résultat présenté dans la figure 2A et 2B illustre une des expériences. Une moyenne ou le calcul de l'écart-type entre les 5 expériences n'a pas été effectué car lors des différentes expériences les valeurs

obtenues ont présenté une certaine fluctuation ce qui rend la mise en commun des 5 expériences un peu risquée. Toutefois, un schéma identique se profile des différentes expériences. A chaque fois une quasi absence d'induction de SA (libre et conjugué) chez *pad2* infecté par rapport à son contrôle a pu être observée. En ce qui concerne Col-0 et Ler, on note une augmentation sensible de SA au cours de la période d'infection entre les plantes non inoculées et celles qui l'ont été, avec la plus forte augmentation chez Ler. Quant aux conjugués (SAG), ces derniers augmentent, au moment où le SA libre commence à diminuer. Du côté de la camalexine, *pad2* présente à 24 heures une valeur 4 fois inférieure à Col-0 mais à partir de 48 heures les valeurs rejoignent celles de Col-0. Pour Ler, on note aussi une forte accumulation de camalexine à partir de 24 heures après le début de l'infection (figure 2C).

Pour l'analyse du contenu en JA (figure 2D) lors de la période d'infection, on note les grandes quantités de JA présents chez Ler et *pad2*, le maximum, non illustré sur le graphique, ayant atteint 11.4 µg par gramme de poids frais chez Ler, 72 heures après le début de l'infection. Ler, tout comme pour les mesures de SA présente les valeurs de JA les plus élevées. Par contre, fait très intéressant, il n'y a qu'une faible induction de JA chez Col-0 inoculé. Il est d'autant plus intéressant de constater que l'expression du marqueur moléculaire de la voie du JA, c'est-à-dire le gène *PDF 1.2* commence à partir de 24 heures chez cet écotype (voir chapitre 2). Il convient toutefois de préciser que l'extraction de JA n'a été effectuée qu'une seule fois et qu'elle devra être répétée afin de pouvoir confirmer les résultats obtenus.

Les mesures de C₂H₄ (figure 2E) ont été effectuées au temps 0 puis en début d'infection, soit après 16 et 23 heures, ainsi qu'en fin d'infection (65 heures). Pour Col-0, Ler et *pad2*, les quantités de C₂H₄ produites au début de la période d'infection sont plus ou moins similaires alors qu'à partir de 23 heures, les différences se font plus marquantes. En effet, cette augmentation de C₂H₄ chez Ler et *pad2* se justifie par le fait qu'à partir de ce moment *P. porri* se trouve dans le tissu et commence à occasionner des dommages aux cellules végétales. Il convient de signaler que, morphologiquement parlant, *pad2* est beaucoup plus atteint que Ler, toutefois cet écotype produit plus de C₂H₄ que *pad2*.

En parallèle aux mesures de C₂H₄ effectuées au cours de la période d'infection, une mesure de la production de C₂H₄ après des blessures occasionnées sur les feuilles à l'aide d'une pincette a été effectuée (figure 2F). A nouveau, on constate que Ler est l'écotype qui produit le plus de C₂H₄ alors que pour Col-0 et *pad2*, les valeurs se tiennent. De ce résultat, on peut conclure que si *pad2* est un mutant de la voie du SA, ce ne semble pas être le cas pour les voies du JA et du C₂H₄.

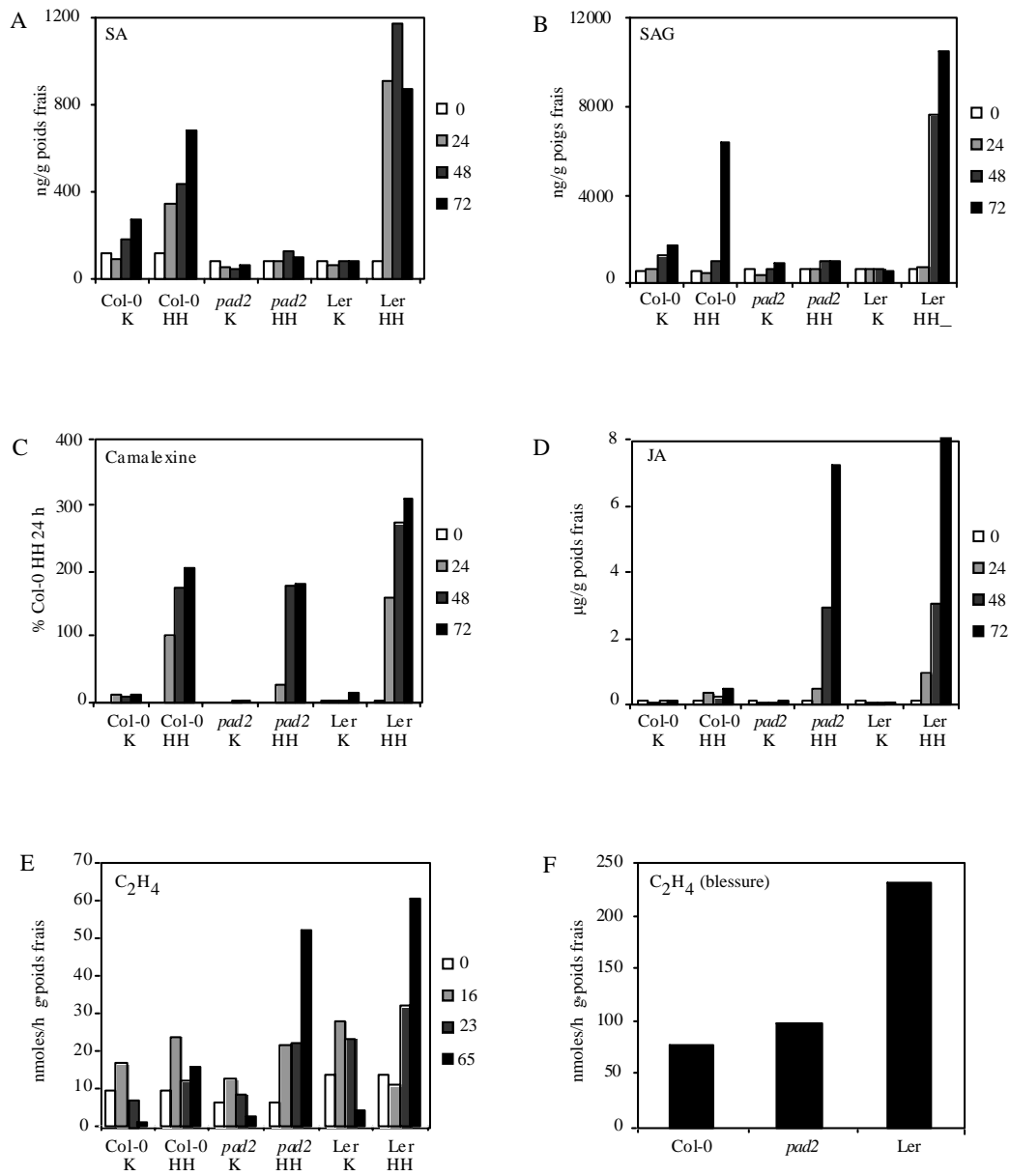


Figure 2. Illustration des différentes mesures effectuées après l'inoculation de Col-0, Ler et *pad2* par l'isolat HH de *P. porri*. Pour (A), (B), (C) et (D), les échantillons ont été récoltés 0, 24, 48 et 72 heures après le début de l'infection.

(A) niveaux d'acide salicylique libre (SA).

(B) niveaux d'acide salicylique conjugué (SAG).

(C) niveaux de camalexine. Par absence de standard pur, les valeurs sont exprimées par rapport à la valeur de Col-0, 24 heures après le début de l'infection.

(D) niveaux d'acide jasmonique (JA).

(E) niveaux d'éthylène (C₂H₄). Les échantillons ont été prélevés 0, 16, 23 et 65 heures après inoculation.

(F) niveaux d'éthylène (C₂H₄) produits 5 heures après blessure du tissu végétal.

Une analyse cytologique, biochimique et moléculaire met en évidence la susceptibilité de *ndr 1-1* et *eds 1.1*, ainsi que la résistance de *ein 2.1* envers *P. porri*

Après avoir étudié les réactions des mutants des voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène (chapitre 2), trois autres mutants ont été étudiés plus en détails. Il s'agit de *ndr 1-1* (non race-specific disease resistance), *eds 1.1* (enhanced disease susceptibility) et *ein 2.1* (ethylene insensitivity). *Ndr 1-1* et *ein 2.1* se trouvent dans l'arrière-fond génétique de Col-0 alors que celui de *eds 1.1* est Wassilewskija (Ws-0).

Les symptômes macroscopiques observables 5 jours après l'inoculation avec l'isolat HH de *P. porri* indiquent que *eds 1.1* est susceptible, que *ndr 1-1* l'est partiellement alors que *ein 2.1* est résistant (figure 3). Il convient de dire que la susceptibilité de *eds 1.1* n'est pas aussi marquée que celle de *pad2* et qu'en ce qui concerne *ndr 1-1*, on observe certaines feuilles qui sont susceptibles alors que d'autres présentent des symptômes de résistance, ceci sur la même plante.

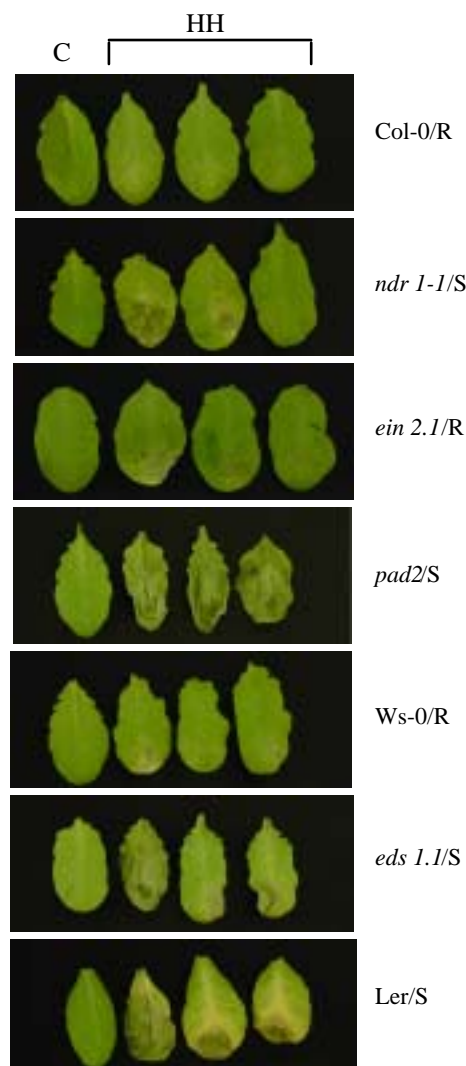


Figure 3. Symptômes macroscopiques tels que l'on peut les observer, 5 jours après l'inoculation des écotypes sauvages Col-0, Ws-0, Ler et des mutants *ndr 1-1*, *ein 2.1*, *pad2* et *eds 1.1* par l'isolat HH de *P. porri*. C représente la feuille contrôle. R= résistant, S=susceptible.

Caractérisation cytologique de *ndr 1-1*, *eds 1.1* et *ein 2.1* lors de l'inoculation par *P. porri*

Par coloration au bleu de Trypan, on constate que les caractéristiques morphologiques observables à la figure 3 se retrouvent au niveau microscopique. En effet, chez Col-0, on peut observer 3 jours après le début de l'infection la réaction hypersensible (HR) d'une cellule de l'épiderme (figure 4A) lorsqu'elle se trouve en contact avec une hyphe de *P. porri* (flèche). Si l'on focalise l'endroit où cette hyphe se situe, on note que non seulement la cellule épidermique réagit mais aussi les cellules situées en dessous, comme le démontrent les zones foncées proches de l'hyphe (flèche) (figure 4B), contribuant ainsi à stopper sa progression. Si l'on observe, toujours chez l'écotype Col-0, la surface des feuilles à un faible grossissement, on note une multitude d'endroits nécrosés comme ceux de la figure 4C, ce qui atteste les tentatives avortées de pénétration de *P. porri*. Chez le mutant *ndr 1-1*, on peut observer des symptômes de résistance (figure 4D), où les hyphes après avoir progressé quelque peu dans le tissu se font stopper par des cellules végétales qui ont effectué une HR (flèches). Chez ce même mutant, on peut aussi clairement observer de la susceptibilité avec les hyphes de *P. porri* qui progressent dans le tissu de manière intercellulaire (flèche) sans provoquer de réaction de la part des cellules végétales (figure 4E). A noter que les feuilles infectées sont du même âge, ce qui exclut à priori une susceptibilité accrue selon l'âge des feuilles. La susceptibilité de *ndr 1-1* n'est toutefois pas aussi prononcée que celle que l'on peut observer chez *pad2* où déjà après 48 heures la quasi totalité du tissu est colonisée (figure 4F). L'interaction entre l'écotype sauvage Ws-0 et *P. porri* résulte en une incompatibilité et présente des symptômes classiques de résistance. La figure 4G illustre la HR d'une cellule de Ws-0 face à une hyphe de *P. porri* (flèche), la présence de matériel granuleux à l'intérieur de cette dernière en atteste la mort. En ce qui concerne *eds 1.1*, on peut observer une colonisation du tissu par les hyphes et ceci déjà à partir de 36 heures après le début de l'infection (figure 4H). Le dernier mutant observé, *ein 2.1* est quant à lui résistant et l'on remarque une belle HR au voisinage d'une hyphe de *P. porri* (figure 4I).

A noter qu'un autre mutant, *eds 1.2*, se trouvant lui dans l'arrière-fond génétique de Ler a aussi été inoculé. Les réactions observées, non illustrées, sont similaires à ceux de l'écotype sauvage, une susceptibilité plus prononcée n'a pas été observée. Ainsi, des résultats obtenus lors de l'inoculation de *ndr 1-1* et *eds 1.1*, il semblerait que la reconnaissance envers *P. porri* nécessite des gènes *NDR1* et *EDS1* fonctionnels.

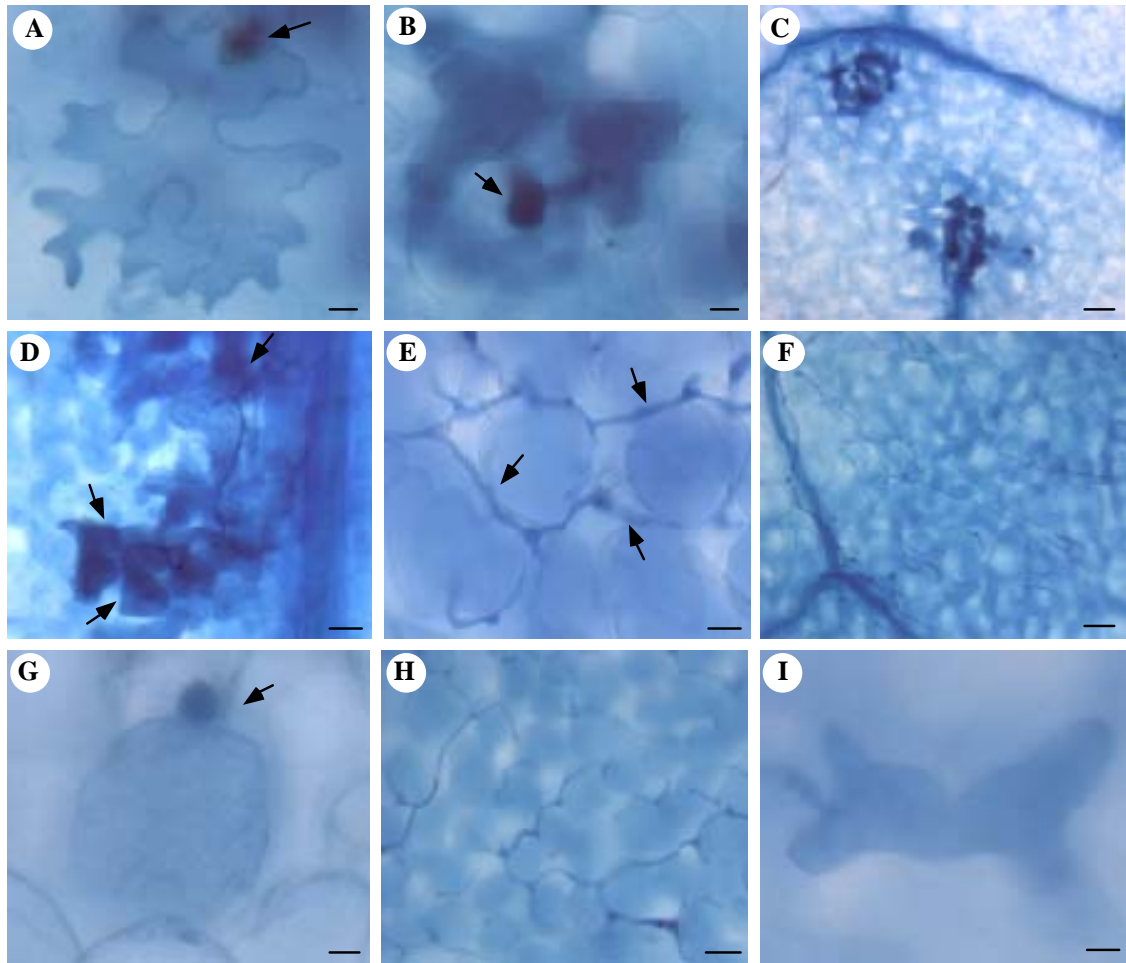


Figure 4. Caractérisation cytologique des interactions entre Col-0, *ndr 1-1*, *ein 2.1*, *pad2*, Ws-0 et *eds 1.1* avec l'isolat HH de *P. porri*. Les observations se sont effectuées en champ clair sur du matériel coloré au bleu de Trypan.

(A), (B) et (C) Réactions hypersensibles (HR) observables trois jours après le début de l'infection chez l'écotype Col-0; (A) HR d'une cellule de l'épiderme due à la présence d'une hyphe de *P. porri* (flèche) (échelle = 50 μm), (B) Cette hyphe est visible à un plan inférieur dans le tissu, on note que d'autres cellules végétales ont également effectué une HR comme le témoignent les zones foncées situées à côté de l'hyphe (échelle = 100 μm), (C) Taches nécrotiques témoignant des HR localisées aux endroits où *P. porri* a tenté de s'introduire dans le tissu végétal (échelle = 100 μm).

(D) et (E) Symptômes différentiels observables chez le mutant *ndr 1-1* trois jours après le début de l'infection; (D) Réaction d'incompatibilité, l'hyphe de *P. porri*, après avoir progressé quelque peu dans le tissu se fait encercler par des cellules qui ont effectué une HR (flèches) (échelle = 75 μm), (E) Symptômes de compatibilité, on note la progression intercellulaire des hyphes (flèches) sans que ces dernières ne soient stoppées (échelle = 50 μm).

(F) Colonisation importante du tissu tel qu'on peut l'observer chez le mutant *pad2* deux jours après le début de l'infection. (échelle = 100 μm).

(G) Réaction hypersensible d'une cellule de l'écotype Ws-0 face à la présence d'une hyphe de *P. porri* (flèche). La mort de la cellule s'illustre par la présence de matériel granuleux dans cette dernière (échelle = 5 μm).

(H) Réaction de compatibilité entre le mutant *eds 1.1* et l'isolat HH de *P. porri* observable deux jours après le début de l'infection. Les hyphes se ramifient dans l'espace intercellulaire sans occasionner de réaction de la part de la plante (échelle = 50 μm).

(I) Réaction d'incompatibilité lors de l'interaction entre le mutant *ein 2.1* et l'isolat HH de *P. porri*, observable trois jours après le début de l'infection. Une cellule réagit de manière hypersensible à la présence d'une hyphe et la progression de *P. porri* est ainsi stoppée (échelle = 10 μm).

Caractérisation biochimique de *ndr 1-1*, *eds 1.1* et *ein 2.1* lors de l'inoculation par *P. porri*

Des mesures du contenu en acide salicylique (SA) et en camalexine ont été effectuées lors de l'inoculation de *ndr 1-1*, *eds 1.1*, *ein 2.1* et de leurs écotypes sauvages respectifs. Deux expériences indépendantes ont été réalisées et de la même manière que pour les résultats présentés précédemment, il s'est avéré difficile d'effectuer une moyenne ou bien de calculer l'écart-type entre les deux expériences à cause des fluctuations obtenues dans les valeurs. Ainsi, le résultat présenté à la figure 5 illustre une expérience dont les prélèvements ont eu lieu 0, 24, 48 et 72 heures après l'inoculation. La teneur en SA et en conjugués (SAG) de *ndr 1-1*, *eds 1.1* et *ein 2.1* a été comparée à celle de leurs contrôles respectifs (figures 5A et 5B). Le mutant *ndr 1-1* présente des quantités de SA qui sont similaires à ceux que l'on peut observer chez Col-0 alors que *eds 1.1* ne produit quasiment pas de SA. En effet, les quantités de SA synthétisés dans certaines plantes contrôles et dans celles qui ont été inoculées, outre le temps 0, se sont révélées tellement faibles qu'elles se sont trouvées en dessous du seuil de détection de l'HPLC. En ce qui concerne *ein 2.1*, ce mutant produit du SA constitutivement car les valeurs de SA et SAG sont déjà relativement élevées au début de la période d'infection et on n'observe pas une grande différence entre les contrôles et les plantes inoculées.

Du côté de l'accumulation de camalexine, on note qu'au cours de la période d'infection, c'est à partir de 48 heures qu'il y a une bonne induction chez tous les mutants (figure 5C). Selon toute évidence une induction de la camalexine ne semble d'une part pas être un facteur déterminant dans les mécanismes de résistance envers *P. porri* et d'autre cette voie de biosynthèse est intacte chez *ndr 1-1*, *eds 1.1* et *ein 2.1*.

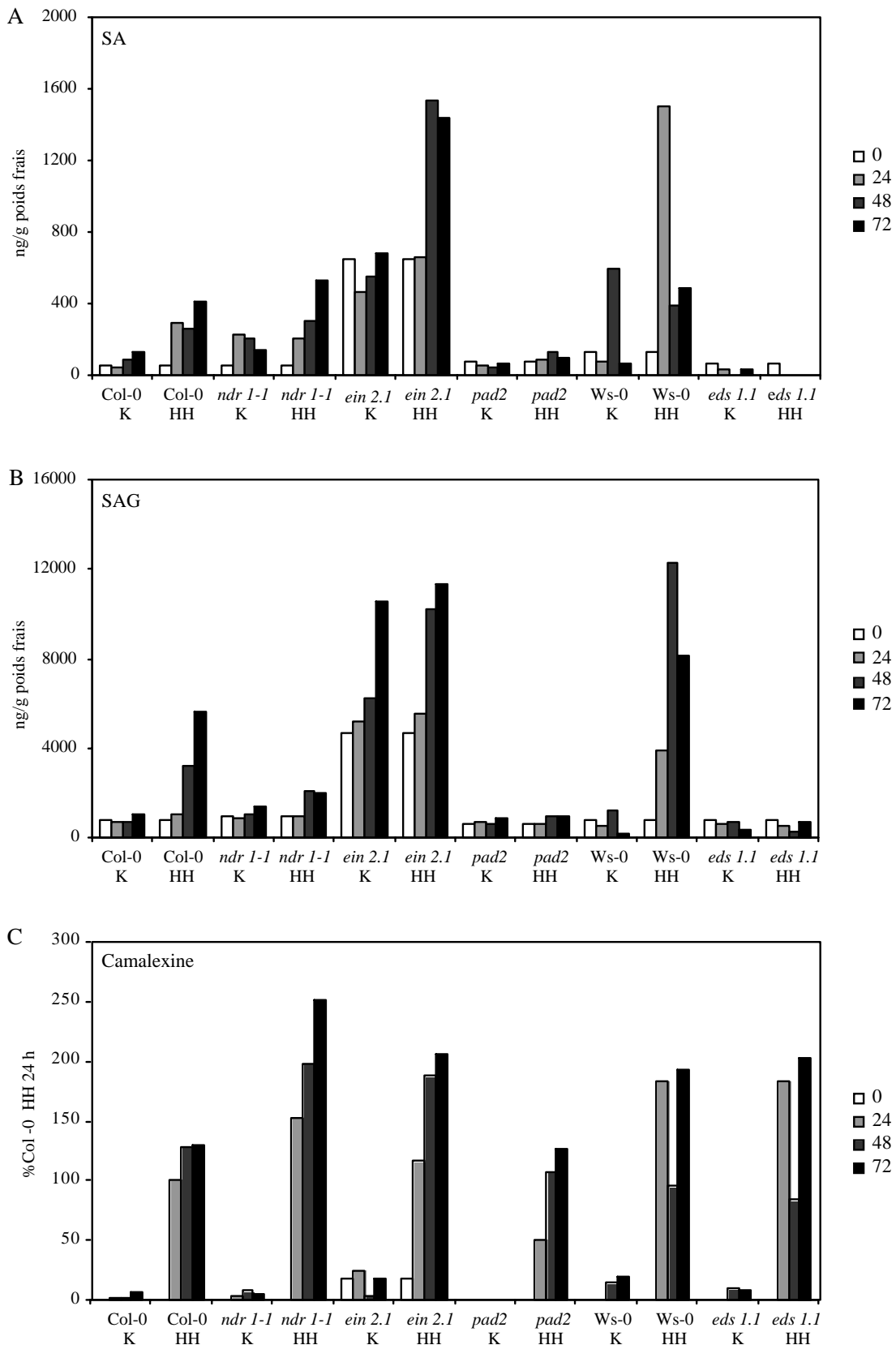


Figure 5. Illustration des mesures effectuées après inoculation de Col-0, *ndr 1-1*, *ein 2.1*, *pad2*, *Ws-0* et *eds 1.1* avec l'isolat HH de *P. porri*. Les échantillons ont été prélevés 0, 24, 48 et 72 heures après le début de l'infection.

(A) niveaux d'acide salicylique libre (SA).

(B) niveaux d'acide salicylique conjugué (SAG).

(C) niveaux de camalexine. Par absence de standard pur, les valeurs sont exprimées par rapport à la valeur de Col-0, 24 heures après le début de l'infection.

Caractérisation moléculaire de *ndr 1-1*, *eds 1.1* et *ein 2.1* lors de l'inoculation par *P. porri*

Les trois mutants et leurs écotypes sauvages respectifs ont aussi été caractérisés par rapport à l'induction des gènes *PR-1* et *PDF 1.2*. Le matériel utilisé pour les northern Blots illustrés à la figure 6 provient de la même inoculation qui a servi pour les extractions d'acide salicylique et de camalexine illustrés à la figure 5.

En ce qui concerne l'induction de *PR-1*, on note la corrélation entre le résultat des extractions de SA et celui des northern, à savoir que chez *eds 1.1* il n'y a quasiment pas d'expression de ce gène au cours de la période d'inoculation et que *ein 2.1* présente une expression de *PR-1* constitutive. Quant à *ndr 1-1*, ce dernier exprime un motif similaire à celui de l'écotype sauvage si ce n'est que chez les contrôles, les plantes étaient plus stressées chez ce mutant que chez Col-0, comme l'atteste l'expression de *PR-1*. Pour ce qui est de l'expression du gène *PDF 1.2*, on note que ce dernier est exprimé de manière relativement importante lors de toutes les interactions.

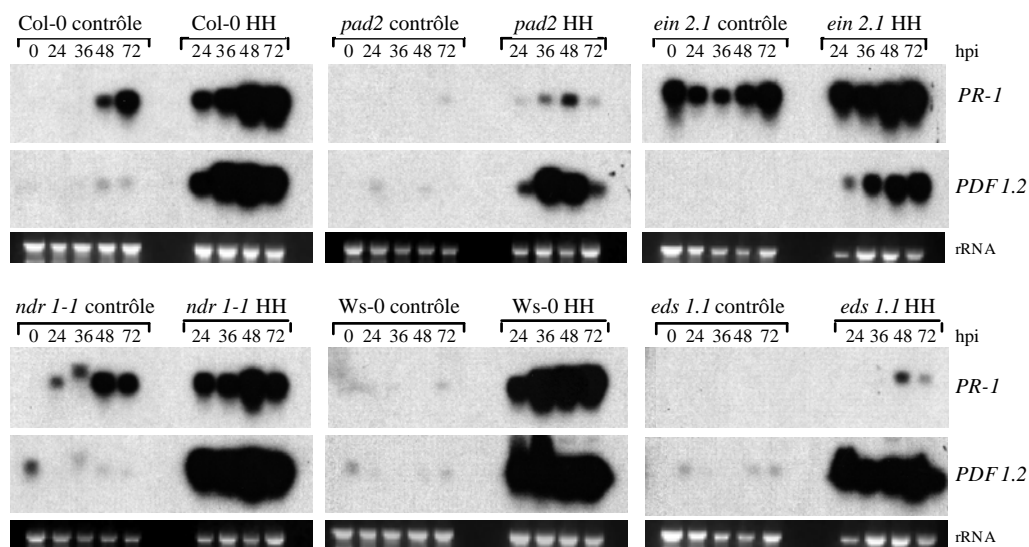


Figure 6. Expression de *PR-1* et *PDF 1.2* lors de l'interaction des écotypes Col-0 et Ws-0 et des mutants *pad2*, *ein2.1*, *ndr 1-1* et *eds 1.1* avec l'isolat HH de *P. porri*. Les échantillons non-inoculés (contrôles) et inoculés ont été prélevés 0, 24, 36, 48 et 72 heures après le début de l'infection. Le bromure d'éthidium (rRNA) permet le contrôle du chargement du gel. Les membranes ont été hybridées avec les cDNAs radiomarqués au de *PR-1*, resp. *PDF 1.2*.

La cartographie du gène de résistance n'a pas été couronnée de succès

Lors de l'étude de la descendance d'un croisement entre les écotypes Ler et Col-0, les résultats obtenus indiquent que la résistance s'hérite de manière dominante et monogénique (chapitre 2). Profitant du polymorphisme existant entre ces deux écotypes ainsi que des nombreux marqueurs RFLP disponibles, des lignées recombinantes (Recombinant Inbred (RI) lines) issues du croisement entre Ler et Col-0 et produites par Lister and Dean (1993) ont été utilisées.

Cent différentes lignées RI ont été inoculées avec l'isolat II et les symptômes macroscopiques observés 5 à 7 jours après le début de l'infection. A noter que l'isolat II occasionne des réactions similaires chez Ler et Col-0 que l'isolat HH. Pour chaque lignée, 15 plantes ont été inoculées et par cycle d'inoculation, 3 lignées ont été testées, ces dernières ayant été à chaque fois accompagnées par

8 contrôles parents. Les plantes des 3 lignées ont été distribuées au hasard dans 4 caissettes avec, dans chaque caissette, 2 contrôles de chaque parent ceci afin d'obtenir une meilleure vue d'ensemble de la reproductibilité des symptômes. Les 40 premières lignées ont été testées deux fois avec, à la clef, un même résultat dans la détermination du phénotype. Ainsi, sur les 100 lignées testées, 39 ont présenté un phénotype résistant, 24 un phénotype susceptible et 37 un phénotype que l'on peut qualifier d'intermédiaire. Par phénotype intermédiaire, il est entendu que certaines lignées ont présenté des plantes avec des feuilles résistantes alors que d'autres étaient susceptibles, tout cela sur une même plante. Un autre phénomène observé était la présence de plantes totalement résistantes et totalement susceptibles à l'intérieur de la même lignée. Confronté à ce genre de cas, il est difficile d'établir un phénotype clair, c'est pour cette raison que ces lignées ont été qualifiées d'indéterminées. L'analyse des données aurait dû permettre une cartographie du gène de résistance sur l'un des 5 chromosomes de Col-0. Malheureusement, le résultat obtenu indique que la position du gène de résistance dépasse la carte du chromosome 1 d'approximativement 35 unités, ce qui n'est guère crédible. Ce résultat laisse ainsi penser qu'il n'y a pas qu'un seul gène de résistance qui est impliqué dans les mécanismes de défense envers *P. porri*.

DISCUSSION

Chez *A. thaliana* la voie de l'acide salicylique et celle de l'acide jasmonique sont impliquées dans les mécanismes de défense envers divers pathogènes et jusqu'à présent il a pu être mis en évidence que l'une ou l'autre voie est responsable des phénomènes de résistance que l'on peut observer. Ainsi, lors de l'interaction entre *A. thaliana* et *Peronospora parasitica*, c'est principalement la voie de l'acide salicylique qui est mise à contribution pour stopper le pathogène (Delaney *et al.*, 1994) tandis que dans l'interaction entre *A. thaliana* et *Alternaria brassicicola*, c'est la voie de l'acide jasmonique qui est impliquée dans les manifestations de résistance (Penninckx *et al.*, 1998). Le pathosystème *A. thaliana*-*P. porri* ne semble toutefois pas être régi par les mêmes mécanismes, du moins pas principalement. En effet, les deux voies sont enclenchées lors de l'interaction mais elles ne semblent pas être la cause de la résistance. L'analyse de mutants de la voie de l'acide salicylique a mis en évidence que ces derniers ne deviennent pas susceptibles envers *P. porri* (chapitre 2). Une autre preuve est apportée par le fait qu'une réaction systémique acquise (SAR), déclenchée préalablement à l'inoculation par *P. porri*, ne permet pas de rendre l'écotype Ler et le mutant *pad2* résistants (figure 1). En effet, chez Ler, l'accumulation préalable du gène *PR-1* ne permet pas d'établir un phénotype résistant et du côté de *pad2*, il n'a pas été possible d'établir une SAR, ce qui confirme que PAD2 doit avoir quelque implication dans la voie de l'acide salicylique. Par conséquent que cette voie soit enclenchée ou non, elle ne semble pas être la principale composante des mécanismes de défense.

En ce qui concerne la voie de l'acide jasmonique, on constate que cette dernière est fortement induite chez l'écotype Ler et le mutant *pad2*, tout comme la production d'éthylène (figures 2D et 2E), lors de l'interaction. Ce qui se retrouve aussi au niveau moléculaire avec l'induction du gène *PDF 1.2* qui est un marqueur pour cette voie (figure 6). Par ailleurs, les mutants de cette voie ne

présentent pas de symptômes de susceptibilité envers *P. porri* (chapitre 2), ce qui exclut cette voie comme étant essentielle pour la résistance. A noter cependant chez Col-0, la faible induction d'acide jasmonique au cours de la période d'infection alors que *PDF 1.2* est induit dès 24 heures après le début de l'infection (figures 2D et 6). En comparaison avec l'interaction entre l'écotype Col-0 d'*A. thaliana* et un isolat avirulent d'*Alternaria brassicicola*, on note que les quantités mesurées d'acide jasmonique sont supérieures d'un facteur 2 à 3 (Penninckx *et al.*, 1998) à celles mesurées dans le présent travail pour Col-0 et *P. porri*. Ceci occasionne deux hypothèses, soit il faut une très faible augmentation du contenu en acide jasmonique pour induire *PDF 1.2* ou alors la corrélation entre le contenu en acide jasmonique et la production de *PDF 1.2* n'est pas si liée qu'on ne le pense. Pour les analyses du contenu en camalexine, on note que cette phytoalexine est synthétisée que l'interaction soit compatible ou non. Elle pourrait aussi jouer un rôle dans les mécanismes de résistance mais là aussi, ce serait peut-être un rôle secondaire car le mutant *pad3* ne présente que des symptômes d'une légère susceptibilité (chapitre 2).

L'analyse des mutants *ndr 1-1* et *eds 1.1* laisse à penser que les mécanismes de résistance empruntent la voie de reconnaissance R-avr. En effet, *eds 1.1* présente un phénotype susceptible tandis que *ndr 1-1* peut être considéré comme partiellement susceptible (figures 3 et 4). Le phénotype de *ndr 1-1* peut être comparé à celui décrit par Century *et al.*, (1995); en effet, il a été remarqué que selon le gène d'avirulence porté par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, même si *ndr 1-1* est susceptible, des réactions hypersensibles (HR) sont induites dans les 24 heures suivant l'infiltration. S'ajoutant à l'observation que différents gènes d'avirulence induisent qualitativement des HR différentes sur plusieurs écotypes d'*A. thaliana*, cela a conduit les auteurs à émettre l'hypothèse qu'un événement de reconnaissance spécifique donné peut initier de nombreux événements secondaires qui, eux, conditionnent le phénotype de résistance. Ainsi, un ou plusieurs de ces événements secondaires nécessiteraient *NDR1*. Comme le même phénomène s'observe lorsque *ndr 1-1* est infecté par l'isolat HH de *P. porri* (figures 4D et 4E), on peut penser que l'hypothèse de Century *et al.*, (1995) peut aussi être valable pour *P. porri*. D'autre part, selon Aarts *et al.*, (1998) et Dong *et al.*, (1998), *ndr 1-1* et *eds 1.1* présentent des voies de reconnaissance qui sont mutuellement exclusives, ce qui reviendrait à penser que la résistance envers *P. porri* n'est pas la conséquence d'un seul gène de résistance. En ce qui concerne l'analyse biochimique et moléculaire de ces deux mutants, on note que *eds 1.1* est un mutant qui agit sur la voie de l'acide salicylique, ce qui se traduit par peu d'acide salicylique produit lors de l'interaction et aucune expression de *PR-1* (figures 5A et 6) durant la période d'infection. Falk *et al.*, (1999), présentent des résultats indiquant une absence d'induction de *PR-1* après inoculation de *eds 1.2* (qui se trouve dans l'arrière-fond génétique de Ler) avec une souche virulente ou avirulente de *P. syringae* pv. *tomato*. Ces résultats rejoignent ceux présentés ici, à noter que *eds 1.2* a aussi été analysé et que les résultats phénotypiques, cytologiques, biochimiques et moléculaires sont semblables à ceux présentés pour *eds 1.1*. Par contre contrairement à Falk *et al.*, (1999), *eds 1.1* et *eds 1.2* expriment *PDF 1.2* lorsqu'ils sont infectés par l'isolat HH de *P. porri* (figure 6), ce qui confirme la capacité d'*A. thaliana* de réagir de manière différentielle selon le type de pathogène. A noter qu'il serait intéressant d'observer les réactions, face à *P. porri*, de *eds 1.1* après application d'acide salicylique, ce qui permettrait de rétablir l'expression de *PR-1* comme démontré dans Falk *et al.*, (1999). Du côté de *ndr 1-1*, ce mutant présente

des réactions biochimiques et moléculaires similaire au type sauvage, Col-0, si ce n'est le phénotype, qui lui est partiellement susceptible envers *P. porri*.

Le dernier mutant analysé, *ein 2.1*, présente un phénotype résistant tout comme l'autre mutant insensible à l'éthylène, *etr 1-1* (chapitre 2). Des analyses du contenu en acide salicylique, on remarque qu'il en produit constitutivement, ce qui est en accord avec Lawton *et al.*, (1994). Par contre, Penninckx *et al.*, (1998) observent que *PDF 1.2* n'est pas induit lors de l'inoculation d'*A. thaliana* par un isolat avirulent d'*Alternaria brassicicola*, de plus la chaîne de transduction conduisant à l'expression de *PDF 1.2* ne serait pas fonctionnelle chez *ein 2.1* car l'expression du gène et de la protéine n'a pas pu être induite après traitement des plantes au paraquat, au méthyl jasmonate ou à l'éthylène. Une telle conclusion entre évidemment en conflit avec les résultats obtenus lors de l'inoculation de *ein 2.1* avec l'isolat HH de *P. porri*. En effet, une induction de *PDF 1.2* est visible à partir de 24 heures après le début de l'infection (figure 6).

La cartographie du gène de résistance sur l'un des 5 chromosomes de l'écotype Col-0 n'a malheureusement pas pu aboutir malgré qu'il semble que le gène de résistance soit hérité de manière dominante et monogénique (chapitre 2). A cela, deux explications peuvent être avancées, d'une part, il est envisageable que la méthode d'inoculation ne se prête pas à l'inoculation de plantes en grand nombre, ce qui aurait eu pour conséquence d'engendrer un grand nombre de faux positifs. Toutefois, cette explication se voit contredite par le fait que les symptômes des contrôles, toujours présents lors de l'inoculation des différentes lignées, ont à chaque fois concordé avec les attentes. L'autre explication se met en rapport avec les résultats obtenus lors de l'analyse des mutants *ndr 1-1* et *eds 1.1*; en effet, le phénotype obtenu étant de la susceptibilité et sachant que ces deux mutants sont mutuellement exclusifs, il serait envisageable que la voie de reconnaissance envers *P. porri* nécessite plus d'un gène de résistance. De plus, lors de l'analyse de la génération F₂ du croisement entre Ler et Col-0, il y a aussi eu des plantes dont le phénotype pouvait être interprété comme indéterminé. Ces quelques plantes n'ont toutefois pas perturbé le calcul statistique. Par contre, sur un total de 1500 plantes inoculées lors du test des lignées RI, ces phénotypes indéterminés revêtent une autre importance et vont naturellement perturber l'analyse visant à trouver un seul gène de résistance. Dès lors, il serait envisageable qu'il y ait plusieurs gènes de résistance actifs lors de la reconnaissance de *P. porri* mais que ces derniers n'aient pas le même degré d'importance. Ce qui expliquerait le phénotype de *ndr 1-1*. De manière générale, les expériences futures qui seront effectuées afin de déterminer la génétique de l'interaction entre *A. thaliana* et *P. porri* confirmeront ou infirmeront l'hypothèse avancée ci-dessus.

En guise de conclusion on peut dire que l'acide salicylique, la camalexine, l'acide jasmonique et l'éthylène peuvent jouer un rôle dans les mécanismes de résistance envers *P. porri* mais ce ne sont toutefois pas les composantes clef du passage résistance/susceptibilité. La voie de résistance implique forcément un gène *PAD2* fonctionnel vu l'extrême susceptibilité de *pad2*. Il est à espérer que ce dernier sera prochainement cloné afin de pouvoir envisager d'autres expériences. D'autre part, le résultat de l'inoculation de *ndr 1-1* et *eds 1.1* laisse peut-être entrevoir d'autres possibilités

d'interprétation visant à expliquer les premiers mécanismes de reconnaissance envers *P. porri* que celles postulées initialement.

METHODES

Maintient et culture de *Phytophthora porri*

Les isolats HH et II (provenant de Dr. F. Govers, University of Wageningen, The Netherlands) ont été maintenus stérilement sur plaque de V8 20% (200 ml de jus V8 (Campbell), 800 ml d'eau distillée, 15 g d'agar et 3,5 g de CaCO₃) et repiqués au minimum une fois par mois à l'aide d'un emporte-pièce (ø 5 mm). Les plaques ont été conservées à l'obscurité et à une température de 18 °C.

Maintient et culture d'*Arabidopsis thaliana*

Les écotypes d'*A. thaliana* utilisés dans les expériences sont, d'une part les écotypes sauvages Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler) et Wassilewskija (Ws-0) et d'autre part les mutants *pad2-1* (Glazebrook *et al.*, 1994), *eds 1.1* et *1.2* (Parker *et al.*, 1996), *ndr 1-1* (Century *et al.*, 1995) et *ein 2.1* (Guzman *et al.*, 1990). Les lignées recombinantes (Recombinant Inbred (RI) lines, (Lister and Dean, 1993)) issues d'un croisement entre Ler et Col-0 ont été obtenues auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), University Park, Nottingham University, U.K.

Après avoir semé les graines sur la terre (un mélange 4:1 de terreau (Triohum Substrat 1, Mauser) et de perlite), les pots ont passé quelques jours à 4°C pour permettre la stratification des graines. Ils ont ensuite été placés en chambre de culture, cette dernière présentant une photopériode de 10 heures par cycle de 24 heures. La température étant de 18-20 °C la journée et de 16 °C la nuit, l'humidité relative durant la journée avoisinant 60% et se situant vers 100% durant la nuit. Lorsque les plantules ont été âgées d'une semaine elles ont été repiquées une par pot (ø 6 cm ou 3.5 cm, dans le cas des lignées RI) et cultivées pendant trois à quatre semaines avant d'être inoculées.

Conditions d'inoculation d'*A. thaliana*

Pour les inoculations, des rondelles de mycélium (ø 5 mm) prélevées sur le bord d'une jeune colonie (4-5 jours) ont été placées sur la face supérieure des feuilles de rosettes âgées de 4 à 5 semaines. Les plantes contrôles ont subi le même traitement avec des rondelles de V8 20% sans mycélium. Les inoculations ont été effectuées dans la chambre de culture en fin d'après-midi, juste avant le début de la phase d'obscurité. Durant les 14 premières heures d'infection, les caissettes ont été fermées avec de la parafilm afin d'atteindre une humidité relative de 100% à l'intérieur. Ensuite, la parafilm a été enlevée de manière à ce que l'humidité relative se situe autour de 70-80% durant tout le temps d'infection.

Les prélèvements ont été effectués à différents points durant la période d'infection selon les expériences. La zone d'inoculation située juste sous la rondelle de mycélium ainsi que les 5 mm avoisinant cette zone ont été récoltés, réduits en poudre à l'aide d'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

En ce qui concerne les inoculations des lignées RI, les symptômes macroscopiques ont été observés durant la semaine qui a suivi l'inoculation.

Traitement au BTH

Les plantes, âgées de 4 semaines ont été traitées au BTH (acide benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothionique S-méthylester) 4 jours avant d'être inoculées avec l'isolat HH de *P. porri*. Pour cela, une solution de BTH (concentration finale: 330 µM) a été appliquée au centre du pot à l'aide d'une pipette. La terre a préalablement été humidifiée pour permettre au BTH de se répartir également dans le pot. Des petites soucoupes ont été placées sous les pots afin d'éviter que le composé chimique ne se disperse au fond de la caissette. La terre des plantes contrôles a été infiltrée de manière similaire avec de l'eau distillée.

Traitement avec *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 *avrRpt2*

Les premières feuilles de rosettes âgées de 4 semaines ont été inoculées avec une suspension de *P. syringae* pv *tomato* DC3000 possédant le gène d'avirulence *avrRpt2* (Wahlen *et al.*, 1991). Les bactéries ont été mises en culture le jour précédant l'inoculation à 28°C dans du milieu LB (Sigma) avec 25 µg/ml de kanamycine et 50 µg/ml de rifampicine. Le matin suivant, la concentration des bactéries a été ajustée à la densité optique (OD₆₀₀) de 0.02 (correspondant à env. 10⁷ cfu). Les inoculations ont été effectuées par infiltrations des bactéries dans la face inférieure des feuilles à l'aide d'une seringue sans aiguille. Comme contrôle, une solution de 10 mM de MgCl₂ a été infiltrée et les plantes ont été couvertes jusqu'au soir. Quatre jours plus tard, les feuilles supérieures des rosettes ont été inoculées avec l'isolat HH de *P. porri*.

Northern Blot

L'ARN total a été extrait de la poudre récoltée au cours de la période d'inoculation selon Zimmerli *et al.*, (2000) et 6 µg a été séparé sur gel d'agarose 1% contenant du formaldéhyde puis transféré sur membrane Hybond-H (Amersham, Pharmacia biotech) selon Sambrook *et al.*, (1989). L'hybridation s'est effectuée avec les cDNAs radiomarqués au ³²P (Radprime DNA Labeling System, Life technologies, Merelbeke, B) de *PR-1* (Uknes *et al.*, 1992) et *PDF 1.2* (Penninckx *et al.*, 1996).

Extraction d'acide salicylique (SA), d'acide jasmonique (JA) et mesures d'éthylène (C₂H₄)

L'acide salicylique contenu dans 250 mg de poudre provenant des échantillons récoltés lors de la période d'infection a été extrait selon Meuwly *et al.*, (1993). Après la dernière évaporation, la phase sèche a été resuspendue dans 200 µl de tampon (15% acétonitrile dans 25 mM KH₂PO₄). Les substances phénoliques contenues dans la phase sèche ont été séparées par HPLC, le long d'un gradient acétonitrile/KH₂PO₄. Les échantillons sont passés sur une colonne Supelco ABZ++ et ont

été détectés sur la base de leur fluorescence (excitation à 305 nm et émission à 365 et 407 nm). La quantité de SA a été calculée en ng/poids frais en comparaison avec le standard interne (100 ng) ainsi qu'en comparaison avec une quantité connue de standard injectée dans la colonne au cours des analyses.

L'acide jasmonique contenu dans 500 mg de poudre provenant des échantillons récoltés lors de la période d'infection a été extrait selon Gundlach *et al.*, (1992). Les séparations par GC-MS se sont effectuées sur une colonne capillaire (25 m x 0.2 mm) BP-225 (Scientific Glass Engineering, Ringwood, Vic, Australia) associée à un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett Packard 5980) lui-même couplé à un détecteur spécifique de masse (Hewlett Packard 5970). La quantité d'acide jasmonique, mesurée sous forme de methyl jasmonate, a été calculée en rapport avec la quantité de standard interne (100 ng).

La mesure de production d'éthylène s'est effectuée à l'aide d'un GC (Hewlett Packard 5890) couplé à un détecteur FID. Les plantes, 3 par mesure, ont été récoltées à différents temps après avoir été inoculées. Elles ont délicatement été extraites de terre puis la racine a été enlevée et chaque rosette a été placée dans un bocal (volume: 90 ml) muni d'un couvercle. Quatre heures plus tard, 250 µl d'air ont été prélevés à l'aide d'une seringue et injectés dans l'appareil. Les séparations se sont effectuées sur une colonne capillaire (10 m x 0.5 mm) Poraplot Q (Chrompack, Antwerp, Belgium) à une température de 50°C avec un flux constant d'hélium (1 ml/min). Le détecteur a été calibré avec de l'hélium contenant 105 ppm d'éthylène (Supelco, Bellafonte, USA). En ce qui concerne les mesures pour les plantes blessées, le tissu végétal de ces dernières a été pincé en plusieurs endroits à l'aide d'une pincette puis les plantes ont été enfermées dans les bocaux comme indiqué précédemment, pendant 5 heures avant que l'analyse ait lieu.

Microscopie

Les colorations au bleu de Trypan du matériel végétal infecté ainsi que celui des contrôles se sont effectuées selon Keogh *et al.*, (1980). Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope Leica DMR équipé du système AxioCam (Zeiss) pour effectuer des photos.

ANALYSE DE PORRINE I, UNE ELICITINE EXPRIMEE *IN VITRO* ET *IN PLANTA* PAR *PHYTOPHTHORA PORRI*

Lorsque *Phytophthora porri* est mis en contact avec *Arabidopsis thaliana*, les symptômes macroscopiques que l'on peut observer 72 heures après le début de l'infection sont d'une part des nécroses, dans le cas de l'incompatibilité, et d'autre part, une destruction du tissu dans le cas de la compatibilité. De telles manifestations morphologiques sont des indices laissant supposer la présence, au début du cycle d'infection, de facteurs d'avirulence ou de pathogénicité issus de *P. porri*. Lors de la recherche de tels facteurs, le filtrat d'une culture liquide de l'isolat HH de *P. porri* a été infiltré dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* et *A. thaliana*. Une protéine de 10 kDa, a été établie comme étant responsable de nécroses chez *N. benthamiana* et d'une réaction différentielle chez *A. thaliana*. Cette protéine, identifiée comme étant une élicitrine a été nommée Porrine I. Il s'agit d'une α -élicitrine qui fait partie d'une famille multigénique, telles les autres élicitines isolées chez de nombreux *Phytophthora*. Elle est par ailleurs uniquement exprimée dans le mycélium de *P. porri* et a été détectée durant l'interaction compatible. Le clonage du gène codant pour Porrine I a permis d'ouvrir la voie à une étude plus approfondie de sa fonction biologique. Toutefois, malgré un certain nombre d'expériences, cette question n'a pas pu être résolue.

INTRODUCTION

Les Oomycètes étant des pathogènes responsables de nombreuses maladies chez les plantes, on leur prête par conséquent un grand intérêt et leur biologie différente de celle des champignons les rend intéressants à étudier. Un aspect important est l'analyse de facteurs sécrétés *in vitro* ou lors de l'interaction entre le pathogène et son hôte. Dans le cas des *Phytophthora*, de petites protéines d'environ 10 kDa sécrétées en culture liquide par la plupart de ces organismes ont été isolées et étudiées plus en détail. Elles ont été nommées élicitines car elles induisent des nécroses chez certaines Solanacées et Brassicacées après avoir été infiltrées dans les feuilles (Ricci *et al.*, 1989; Kamoun *et al.*, 1993a). Il existe plusieurs types d'élicitines et elles ont été regroupées en 5 classes selon leurs caractéristiques biochimiques ainsi que par la comparaison de leurs séquences d'ADN (Kamoun *et al.*, 1997b). Le premier type d'élicitines à avoir été isolé englobe les élicitines acides (les α -élicitines, $pI < 5$) et les élicitines basiques (les β -élicitines, $pI > 7.5$). Ces deux catégories d'élicitines présentent des séquences en acides aminés quasiment semblables et ne se différencient que sur certaines positions, ce qui leur confère leur caractère acide ou basique. Ces deux formes d'élicitines se rencontrent chez certains *Phytophthora*; cependant, on peut dire de manière générale, que les α -élicitines sont toujours produites alors que les β -élicitines ne sont sécrétées que chez certaines espèces. Leur pouvoir nécrosant est toutefois sujet à quelque controverse; en effet, les β -élicitines sont généralement considérées comme plus toxiques que les α -élicitines lorsqu'elles sont

appliquées sur le pétiole de feuilles de tabac (Nespoulous *et al.*, 1992). Alors que selon Kamoun *et al.*, (1993a), il n'y a pas de différences entre les symptômes causés par les deux types d'élicitines lorsqu'elles sont infiltrées dans les feuilles de certaines Solanacées et Brassicacées. Les symptômes histologiques observés après une application d'élicitines sont la destruction rapide des chloroplastes ainsi que la mort de cellules, conduisant à une destruction des cellules du parenchyme (Milat *et al.*, 1991). D'autre part, une production d'éthylène, une accumulation de phytoalexines ainsi qu'une peroxydation de lipides, cette dernière corrélant avec l'apparition de nécroses, ont aussi été observées (Milat *et al.*, 1991; Rustérucci *et al.*, 1996)

INF1, une élicitine sécrétée par *Phytophthora infestans* a pu être mise en évidence lors de l'interaction avec la pomme de terre (Kamoun *et al.*, 1997a) et cette même élicitine a été démontrée comme étant la cause des nécroses observées chez le tabac après son infiltration (Kamoun *et al.*, 1998). Une corrélation entre la production d'une élicitine chez différents isolats de *Phytophthora parasitica* et leur avirulence sur le tabac a aussi pu être établie (Ricci *et al.*, 1992; Bonnet *et al.*, 1994). En outre, une application exogène d'élicitines induit aussi certains gènes connus, pour avoir une expression corrélée avec l'établissement de la réaction systémique acquise (SAR) (Keller *et al.*, 1996) et il semblerait qu'il y ait aussi induction de nouveaux gènes associés à la SAR (Ponchet *et al.*, 1999). Par ailleurs, des études sur le site d'interaction potentiel de ces protéines avec les cellules végétales ont conduit à l'identification de glycoprotéines situées sur la membrane plasmique qui pourraient jouer le rôle de récepteurs (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999). Il a donc été postulé que les élicitines jouent le rôle de facteurs d'avirulence, du moins pour l'interaction entre les *Phytophthora* et le tabac (Kamoun *et al.*, 1993b; Yu, 1995).

La fonction biologique des élicitines est, quant à elle, actuellement encore peu claire. Les *Phytophthora* étant incapables de synthétiser des stérols, il est supposé que les élicitines pourraient servir de véhicules à stérols extracellulaires. En effet, ces dernières possèdent un site actif présentant une forte affinité pour le déhydroergostérol (DHE) et il a été prouvé que les phytostérols peuvent lier les élicitines de manière similaire. De même, les élicitines peuvent catalyser le transfert de stérols entre des membranes phospholipidiques artificielles (Mikes *et al.*, 1997; 1998). Elles sont aussi capables de capturer les stérols se situant dans des membranes biologiques ainsi que de transférer le DHE depuis des liposomes vers le plasmalemma de vésicules isolées (Vauthrin *et al.*, 1999). Toutefois il convient de dire que la question de la dépendance des Oomycètes envers les stérols reste ouverte. En effet, certaines espèces peuvent synthétiser ces composés alors que d'autres pas du tout et pourtant leur développement ne s'en voit altéré d'aucune manière.

Dans le pathosystème *A. thaliana*-*P. porri*, on constate que l'écotype Columbia est capable de reconnaître la présence du pathogène car il y a formation de nécroses, découlant de réactions hypersensibles observables microscopiquement. Par contre, l'écotype Landsberg erecta ne doit pas posséder un tel mécanisme de reconnaissance car *P. porri* est capable d'entrer dans le tissu végétal et les réactions phénotypiques sont un flétrissement et un jaunissement des feuilles concernées. Ces manifestations morphologiques laissent à penser que *P. porri* sécrète des métabolites lors du processus d'infection, du moins pendant les premiers temps. Les résultats présentés illustrent

l'isolation d'une élicitrine, la Porrine I, secrétée en culture liquide par l'isolat HH de *P. porri*. Cette protéine a été caractérisée de plus près ainsi que son expression lors de l'interaction entre *A. thaliana* et *P. porri*.

RESULTATS

Une protéine exprimée en culture liquide par *Phytophthora porri* induit des nécroses chez *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana*

Lorsque *Phytophthora porri* est cultivé en milieu liquide et que le filtrat issu de cette culture est analysé, on observe qu'un certain nombre de protéines ont été sécrétées dans le milieu liquide (figure 1). Or, il est connu que des protéines sécrétées par les pathogènes, lorsque ces derniers sont placés en culture liquide, peuvent être reconnues par les plantes après que le filtrat leur a été infiltré. Cette reconnaissance peut déclencher un certain nombre de réactions de défense, comme par exemple des dépôts de callose, des nécroses ou encore induire une réaction systémique acquise (SAR). C'est pour cette raison que ces protéines sont généralement qualifiées d'éliciteurs.

Dans l'interaction entre *A. thaliana* et *P. porri*, il est fort probable que le pathogène sécrète des protéines que l'écotype Columbia (Col-0) est capable de reconnaître alors que l'écotype Landsberg erecta (Ler) ne le peut pas, ou du moins pas assez rapidement pour pouvoir se défendre. Ce filtrat de culture, illustré à la figure 1, étant susceptible de contenir des éléments pouvant être reconnus par *A. thaliana*, il a donc été testé par infiltration. En parallèle, la même expérience a été réalisée sur *Nicotiana benthamiana*; le choix de cette Solanacée est motivé par la sensibilité de cette espèce envers divers éliciteurs et constitue de ce fait un bon contrôle positif. En ce qui concerne *P. porri*, l'intérêt s'est surtout dirigé vers l'isolat HH car c'est celui qui présente le plus d'avantages pour la croissance *in vitro* ainsi que pour l'étude des interactions avec *A. thaliana*.

La quantité de protéines contenue dans le filtrat a été estimée à 0.7 mg/ml de tampon. La protéine présente aux alentours de 10 kDa, et indiquée par une flèche dans la figure 1, en représente incontestablement la majeure partie. Une infiltration (20 µl par point d'infiltration) avec trois différentes concentrations (7 µg/ml, 0.7 µg/ml et 0.07 µg/ml) de cet extrait protéique a été effectuée dans des feuilles de *N. benthamiana* âgées de 5 semaines. Les écotypes Col-0 et Ler d'*A. thaliana* ont été soumis au même traitement, à la différence des concentrations infiltrées (7 µg/ml, 3.5 µg/ml et 0.7 µg/ml). Comme contrôles, le tampon ainsi que le filtrat issu de la mise en culture de rondelles de V8 sans mycélium ont été infiltrés. Les symptômes observés 3 à 4 jours plus tard sont illustrés à la figure 2.

Par les réactions observées chez *N. benthamiana*, on peut en déduire qu'une composante de cet extrait protéique agit comme un éliciteur, ce qui conduit à la formation de nécroses. Chez *A. thaliana*, on assiste par contre à une réaction différentielle car Ler réagit en formant des nécroses alors que ce n'est pratiquement pas le cas chez Col-0. Les infiltrations des contrôles n'ont donné aucune réponse chez *N. benthamiana* et *A. thaliana*, ce qui exclut une composante du milieu de culture comme responsable de ces réactions. L'expérience a été répétée et des résultats analogues ont été obtenus. Par conséquent, il y a de fortes chances que la protéine située aux alentours de 10

kDa au vu de sa quantité présente dans cet extrait protéique soit responsable des réactions observées chez *N. benthamiana* et *A. thaliana*.

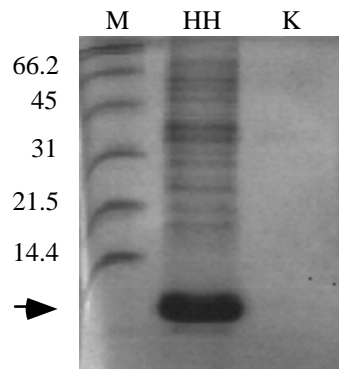


Figure 1. Illustration des protéines sécrétées en culture liquide par l'isolat HH de *P. porri*. Les poids moléculaires du marqueur sont indiqués en kDa. K représente le contrôle, c'est-à-dire le milieu de culture contenant des rondelles de V8 sans mycélium. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

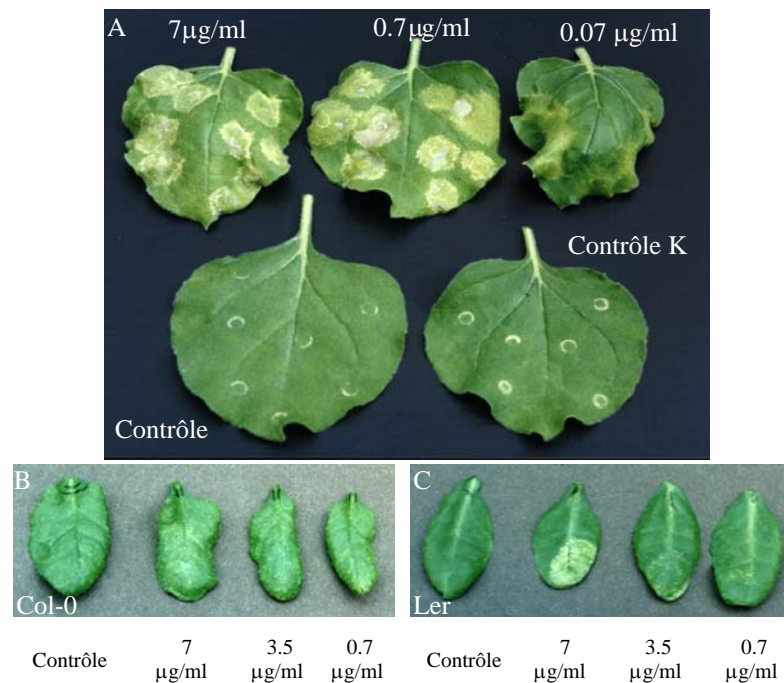


Figure 2. Symptômes observables 5 jours après infiltration de différentes concentrations de l'extrait protéique issu d'une culture liquide de l'isolat HH de *P. porri*. (A) Infiltration de *Nicotiana benthamiana*, les contrôles correspondent d'une part au tampon (contrôle) et d'autre part au milieu de culture sans *P. porri* (contrôle K). (B) et (C) Infiltration des écotypes Col-0, resp. Ler d' *A. thaliana*, le contrôle correspond au tampon.

La protéine induisant des nécroses est une élicitrine

La protéine située aux environs de 10 kDa a donc été séquencée et trois séquences ont été obtenues: APCTPTQQTAAFSALVGILS, ATALPTTAQYKLMTA et MEIFVKTLAGKTIV. Après recherche dans les banques de données, ces dernières ont indiqué que les deux premières séquences sont homologues avec les élicitines isolées chez différentes espèces de *Phytophthora*. Avec les informations obtenues, il n'était toutefois pas encore possible de déterminer il s'agissait d'une α -élicitrine ou d'une β -élicitrine. Certains *Phytophthora* étant capables de sécréter des élicitines acides et basiques (Huet *et al.*, 1992; Le Berre *et al.*, 1994), cette élicitrine, probablement pas la dernière qui sera isolée chez *P. porri*, a été nommée Porrine I. A noter que la troisième séquence est, quant à elle, homologue à une ubiquitine faisant partie d'une famille multigénique qui a été mise en évidence *in vitro* et *in planta* lors de l'interaction entre la pomme de terre et cet Oomycète (Pieterse *et al.*, 1991; Huet *et al.*, 1994). Cette ubiquitine n'a toutefois pas été l'objet d'une étude plus approfondie.

Les élicitines étant considérées comme des éliciteurs spécifiques au genre pour les Solanacées alors que ce seraient plutôt des éliciteurs spécifiques à l'espèce pour les Brassicacées (Ricci *et al.*, 1989, Kamoun *et al.*, 1993a), on peut dire que Porrine I ne semble pas différer de ces constatations. En effet, chez *A. thaliana* cette élicitrine semblerait plutôt agir comme un facteur de pathogénicité car il y a une réaction uniquement chez l'écotype qui est susceptible à l'isolat HH de *P. porri*. Il convient cependant d'ajouter que la quantité de Porrine I infiltrée dans les feuilles d'*A. thaliana* est supérieure aux quantités décrites dans la littérature ce qui pourrait expliquer pourquoi, dans la littérature, une activité nécrosante due à une infiltration d'élicitines n'a pas été observée pour *A. thaliana* (Kamoun *et al.*, 1993a).

Clonage de porrine I

Des tentatives de purification de Porrine I par FPLC avec des colonnes échangeuses d'ions ont été effectuées. Une purification complète n'a toutefois pas pu être atteinte à cause d'un certain nombre de problèmes techniques qui n'ont pu être résolus. Il a donc semblé judicieux de cloner le gène codant pour cette élicitrine afin d'avoir la possibilité d'effectuer une étude plus approfondie de cette protéine, dont celle de son expression ainsi que de sa fonction biologique.

Des deux séquences obtenues lors du séquençage protéique, la première correspond au début de la protéine tandis que la seconde commence environ 20 acides aminés plus loin. La première étape a donc consisté à "remplir" l'espace entre ces deux séquences. Pour cela, une PCR sur un cDNA (obtenu par transcription inverse sur de l'ARN poly(A)+) avec des amorces dégénérées (voir méthodes), a permis de rétablir la partie manquante. Ensuite, à partir de la séquence interne, deux amorces spécifiques ont été élaborées et utilisées pour effectuer une PCR inverse sur de l'ADN génomique (voir méthodes). Les différents fragments amplifiés ont été clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) et séquencés. Les informations obtenues ont permis de déduire la séquence codant pour porrine I ainsi qu'une partie du promoteur et la fin du gène. Une autre PCR a été effectuée sur de l'ARN poly(A)+ afin de déterminer la séquence de l'extrémité 5' mais

n'a toutefois pas conduit à un résultat concluant. Cependant, avec les informations récoltées, une homologie avec le 5'UTR de *P. infestans* a pu être établie. Sur la base de cette homologie, la séquence du 5'UTR de porrine I a pu en être déduite. La détermination de la séquence de l'extrémité 3' a, par contre, été plus concluante. Les informations obtenues durant les différentes étapes de ce clonage, ainsi que l'alignement avec quelques autres élicitines connues sont réunies sous les figures 3 et 4.

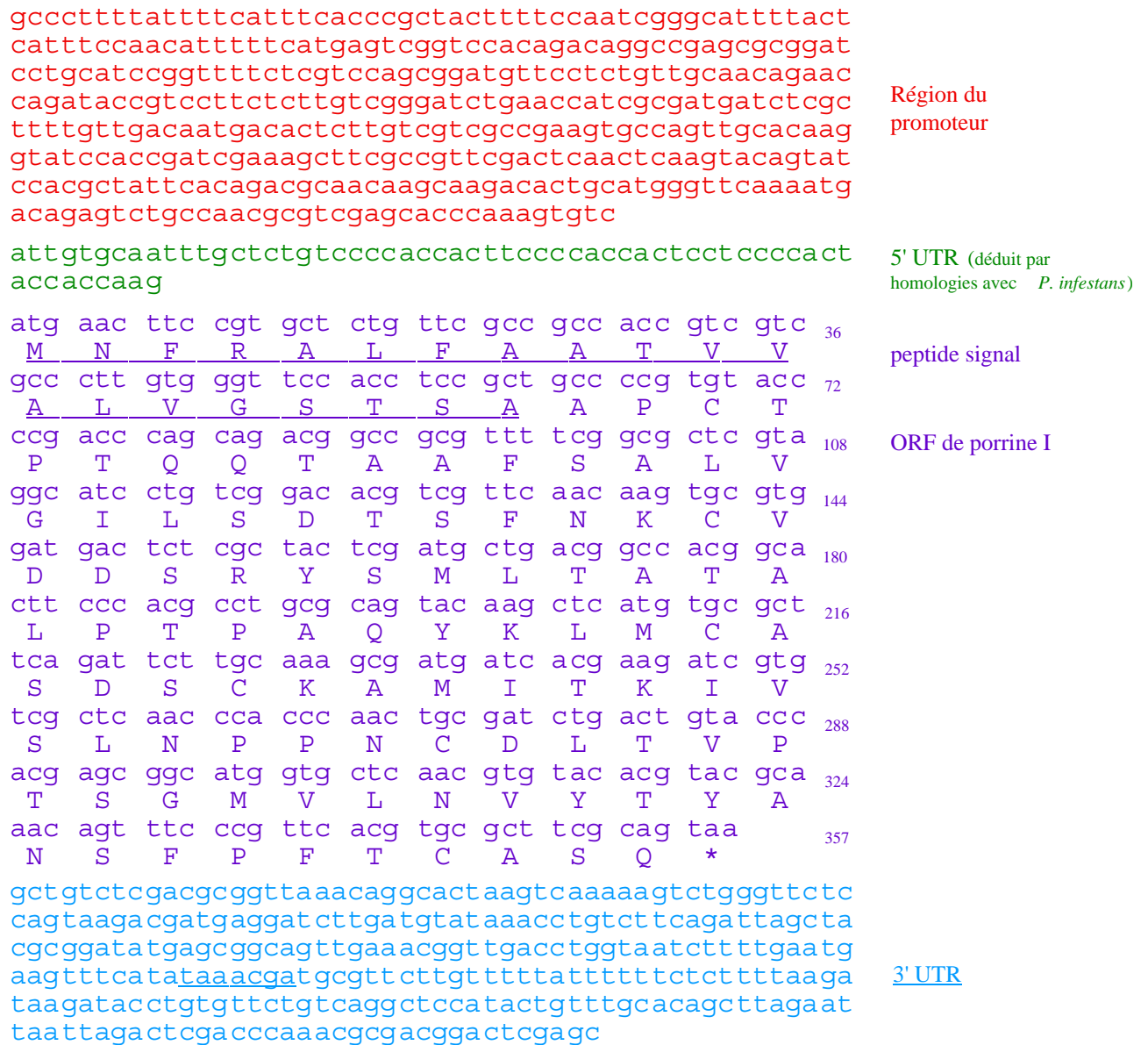


Figure 3. Illustration des informations obtenues lors des différentes étapes du clonage de porrine I. PORRINE I est composée de 99 acides aminés, avec un peptide signal long de 20 acides aminés.

Ainsi, on peut en déduire que Porrine I est synthétisée sous forme de pré-protéine et que le peptide signal doit être clivé lors de l'étape de sécrétion. Son pI calculé est de 6.14, ce qui la place dans la classe des α -élicitines, toutefois il ne s'agit pas d'une élicitine hautement acide. Le poids moléculaire prédit est de 10 kDa, semblable aux autres élicitines des *Phytophthora*.

parasiticéine	TTCTTTQQTA	AYVALVSILS	DTSFNQCSTD	SGYSMLTATS	LPTTEQYKLM
capsicéine	ATCTTTQQTA	AYVALVSILS	DSSFNQCSTD	SGYSMLTATA	LPTTAQYKLM
Porrine I	APCTPTQQTA	AFSALVGILS	DTSFNKCVDD	SRYSMLTATA	LPTPAQYKLM
cinnamomine	TACTATQQTA	AYKTLVSILS	ESSFSQCSKD	SGYSMLTATA	LPTNAQYKLM
megaspermine	TACTTTQQTA	AYKTLVSILS	ESSFNQCSTD	SGYSMLTATA	LPTNAQYKLM
	** * * * * *	* ** * * *	** * *	* * * * * * * *	** * * * * *
parasiticéine	CASTACKTMI	NKIVSLNPPD	CELTVPSTGL	VLNVFTYANG	FSSTCASL
capsicéine	CASTACNTMI	TKIVSLNPPD	CGLTVPTSGL	VLNVYSYANG	FSATCASL
Porrine I	CASDCKAMI	TKIVSLNPPN	CDLTVPTSGM	VLNVYTYANS	FPFTCASQ
cinnamomine	CASTACNTMI	KKIVALNPPD	CDLTVPTSGL	VLDVYTYANG	FSSKCASL
megaspermine	CASTACKSMI	NKIVVLNPPD	CDLTVPTSGL	VLDVYTYANG	FSTKCASL
	** * *	* ** * * * *	* * * * * * * *	** * * * *	* * * *

Figure 4. Alignement de Porrine I, sans le peptide signal, par rapport à deux α -élicitines (parasiticéine et capsicéine) et deux β -élicitines (cinnamomine et megaspermine). Les acides aminés identiques sont indiqués par une *.

Porrine I fait partie d'une famille mutigénique et est exprimée *in vitro* ainsi qu'*in planta*

Pour procéder à un Southern blot, de l'ADN génomique des isolats HH et A a été digéré avec les enzymes XhoI, PstI et SalI, ces dernières ne coupant pas dans le cadre de lecture de l'élicitine. Après transfert et hybridation, le résultat obtenu est illustré à la figure 5. A l'instar des autres élicitines connues, porrine I fait partie d'une famille multigénique comptant entre 8 et 11 gènes selon l'enzyme de restriction utilisée. A noter qu'il y a une copie du gène en moins pour l'isolat A. Selon l'intensité du signal obtenu, un certain nombre de copies sont relativement similaires à la sonde tandis que d'autres copies semblent présenter une similarité moins importante mais tout de même suffisante pour que la sonde puisse hybrider.

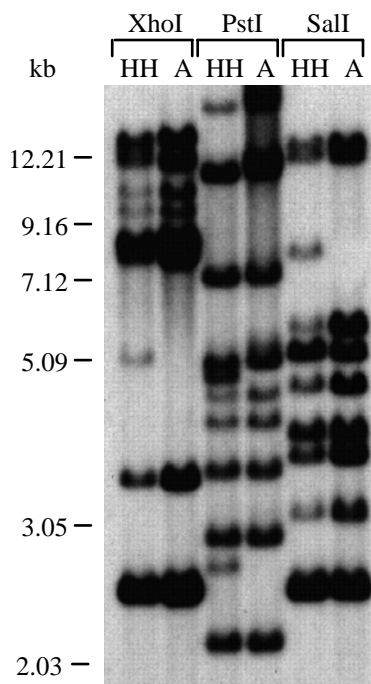


Figure 5. Southern blot, 4.5 μ g d'ADN génomique des isolats HH et A a été digéré avec différentes enzymes. La membrane a été hybridée avec le cDNA de porrine I. Les tailles du marqueur sont indiquées en kilobases.

Pour l'étude de l'expression de porrine I *in vitro* (figure 6A), le mycélium a été récolté à plusieurs points après la mise en culture de zoospores dans le milieu adéquat. Tandis que pour l'étude *in planta* (figure 6B), les deux interactions compatibles ont été analysées, c'est-à-dire l'interaction entre Ler et HH, ainsi que celle entre le mutant *pad2* et HH.

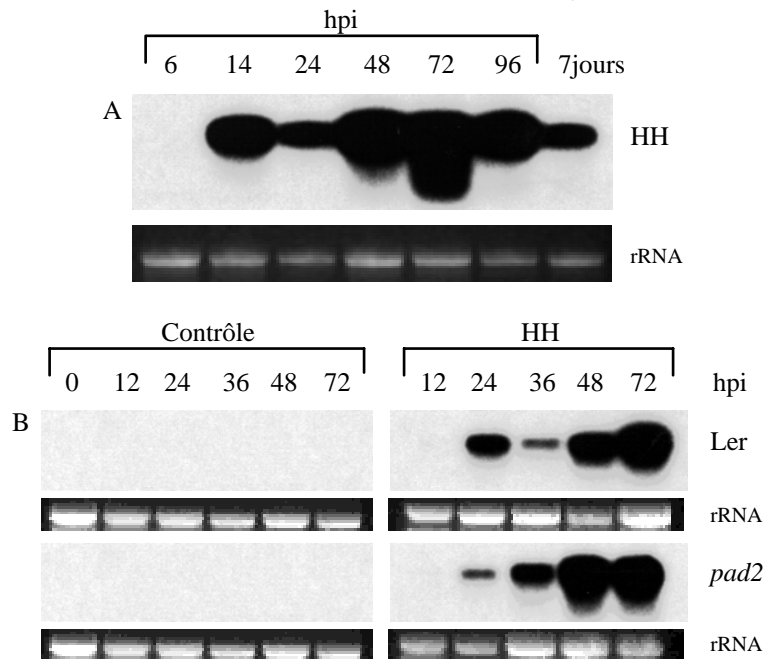


Figure 6. Northern Blots illustrant l'expression de porrine I chez l'isolat HH de *P. porri*.
(A) Expression *in vitro*. Les échantillons ont été récoltés à différents temps après la mise en culture de zoospores.
(B) Expression *in planta* lors de l'interaction avec l'écotype Ler et le mutant *pad2*. Le prélèvement des échantillons s'est effectué 0, 12, 24, 36, 48 et 72 heures après le début de l'infection. 2 µg (A), resp. 15 µg (B) d'ARN total ont été chargés et les membranes ont été hybridées avec le cDNA de porrine I.
 Le bromure d'éthidium (rRNA) permet la visualisation du chargement des gels.

Les élicitines des autres Phytophthora ont la particularité d'être exprimées seulement dans le mycélium et pas dans d'autres stades, tels les zoospores, les cystes qui germent ou encore les sporanges (Tercé-Laforgue *et al.*, 1992; Kamoun *et al.*, 1997a). Porrine I, n'est sur cet aspect là, pas différente car on note le début de l'expression de l'ARN messenger à partir de 14 heures après la mise en culture, ce qui correspond au stade de jeune mycélium. A partir de ce moment, l'expression de porrine I est constitutive.

Lors de l'infection, dans le cas de l'interaction compatible, les hyphes commencent à entrer dans le tissu végétal après 18-20 heures. Par coloration au bleu de Trypan, il a pu être observé qu'à partir de ce moment-là, le mycélium, encore peu ramifié, commence à envahir l'espace intercellulaire avant de s'étendre dans tout le tissu (Roetschi, 1997). Les symptômes visibles apparaissant à partir de 3 jours après le début de l'infection, le tissu végétal se fait complètement détruire les jours suivants. Il est dès lors difficile d'en extraire de l'ARN, particulièrement dans le cas de *pad2* qui est très susceptible. L'expression de porrine I commençant donc après 24 heures chez Ler et *pad2*, cela correspond bien au moment où les hyphes se trouvent dans le tissu végétal. Ensuite, à mesure que la biomasse de *P. porri* augmente dans le tissu, les hyphes progressent, le signal devient lui aussi plus prononcé.

Il convient de signaler que le chargement des échantillons n'est pas toujours égal, comme l'atteste la visualisation du gel au bromure d'éthidium (rRNA), ce qui explique les différences observées entre les intensités du signal. Toutefois, en ce qui concerne Ler au point d'infection à 36 heures, le signal est faible mais ceci n'est pas dû au chargement inégal. L'explication doit être cherchée dans le processus d'infection. En effet, la méthode d'inoculation, même si parfaitement reproductible, présente parfois des "ratés" et malgré la récolte de plusieurs plantes par point d'infection, il arrive que certains échantillons ne présentent pas un bon taux d'infection. Dans le cas du point 36 chez Ler, si on observe le signal aux points 24 et 48, on peut en déduire que l'infection a été un peu moins prononcée sur les plantes récoltées après 36 heures car il est peu probable que le processus d'infection marque une pause de quelques heures avant de reprendre de plus belle.

Après avoir étudié l'expression de l'ARN messager, il convenait aussi de s'intéresser à l'expression de la protéine lors de l'interaction. Pour cela une analyse d'homogénats ainsi que du fluide intercellulaire (IWF) issus d'une inoculation de Ler et *pad2* avec l'isolat HH a été effectuée. Les échantillons ont été prélevés 2, 3, et 4 jours après inoculation et analysés par gel de tricine (16%) avec une coloration au nitrate d'argent. Dans les homogénats, non illustrés, aucune protéine plus petite que 14 kDa n'a pu être visualisée. Par contre, lors de l'analyse de l'IWF, une bande située vers 5 kDa, présente dans les échantillons provenant de *pad2*, prélevés 2 et 3 jours après inoculation a pu être mise en évidence (figure 7). Après séquençage, il s'est avéré que la protéine en question est une défensine, la PDF1.2 (Epple *et al.*, 1997). Cette protéine, associée la défense et présentant des propriétés antifongiques, est un marqueur de la voie de l'acide jasmonique chez *A. thaliana* (Penninckx *et al.*, 1996). Ce résultat, bien que n'ayant pas un rapport direct avec l'élicite, rejoint les résultats de la caractérisation moléculaire de l'interaction où il a pu être mis en évidence que le gène PDF 1.2 est exprimé tant chez Col-0, Ler et *pad2* alors que les deux écotypes et le mutant réagissent de manière différentielle envers l'isolat HH de *P. porri* (chapitres 2 et 3).

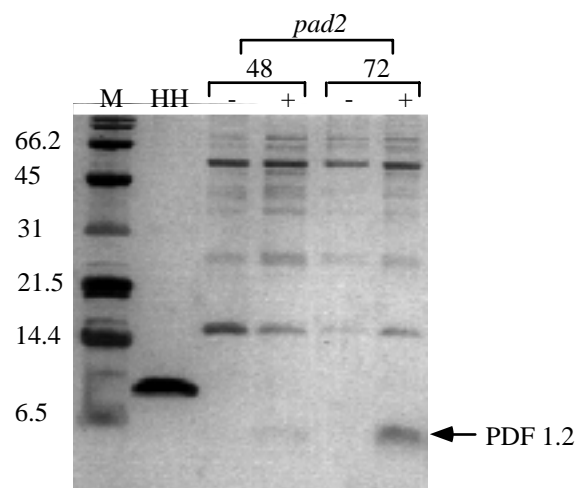


Figure 7. Analyse de l'IWF lors de l'infection du mutant *pad2* par l'isolat HH de *P. porri*. La flèche indique la protéine PDF 1.2. Les prélèvements ont été effectués 48 et 72 heures après infection. - feuilles non infectées, + feuilles infectées par HH. M: marqueur (en kDa). HH: extrait protéique de culture liquide dilué 100 fois et contenant PORRINE I comme seule protéine encore visible. Le gel a été coloré au nitrate d'argent.

Les expériences citées ci-dessus ont été répétées et des western Blots ont été effectués. La détection a été réalisée avec un anticorps pouvant reconnaître les élicitines acides et basiques (aimablement fourni par le laboratoire de P. Ricci, Antibes, France) et également Porrine I. Cependant, aucune protéine n'a pu être détectée, si ce n'est le contrôle positif, c'est-à-dire PORRINE I provenant des cultures liquides.

Etude de l'expression hétérologue de GST-PORRINE I dans *E. coli*

Afin de pouvoir démontrer que le produit de cette élicitine est biologiquement actif, le cDNA de porrine I a été cloné dans le vecteur d'expression pGEX-5X-1 (Pharmacia Biotech). Ce vecteur permet l'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée à une glutathione S-transférase (GST). Le poids moléculaire de la GST sans insert (GST-vide) est de 26 kDa alors que celui de la GST fusionnée à porrine I (GST-PORRINE I) se situe aux environs de 36 kDa.

Après induction des bactéries à l'aide d'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), les extraits protéiques obtenus (fractions solubles et insolubles) ont été analysés par SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie. La présence du vecteur vide (GST-vide) a été révélée dans les fractions solubles alors que GST-PORRINE I n'a jamais été présente dans ces fractions (figure 8).

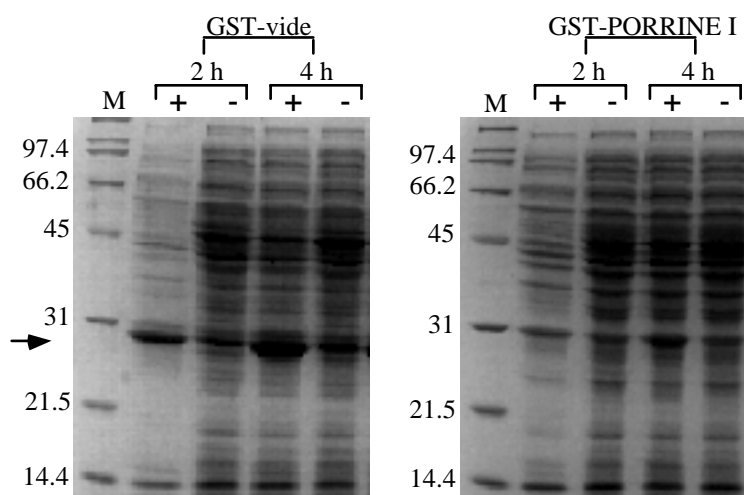


Figure 8. Analyse de la fraction soluble de bactéries, ayant exprimé GST-vide ou GST-PORRINE I, 2 et 4 heures après induction avec l'IPTG (concentration finale: 1 mM). - = bactéries non induites, + = bactéries induites. La flèche indique la position du vecteur vide. Les poids moléculaires du marqueur (M) sont indiqués en kDa. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

La protéine de fusion n'apparaissant pas dans la fraction soluble, la fraction insoluble a donc été resolubilisée dans le tampon de charge et soumise à une autre électrophorèse. GST-PORRINE I s'est effectivement révélée être présente dans la fraction insoluble, ce qui indique la présence de corps d'inclusions. Diverses alternatives ont été essayées, telle la diminution de la concentration d'IPTG (figure 9), la récolte des bactéries peu de temps après induction (entre 45 min et 2 heures), l'induction à une densité optique plus élevée (OD_{600} 1.5 au lieu de 0.6) avec un prélèvement plus rapide (entre 45 min et 1 heure 30) après induction ou encore la culture des bactéries à une température inférieure à leur optimum, afin d'empêcher une production trop rapide de GST-

PORRINE I et son empaquetage subséquent dans les corps d'inclusions. Il a aussi été procédé à un changement d'hôte, la souche BL21(D3) d'*E. coli* a été testée. Malgré tous ces essais et changements, il n'a pas été possible de rendre la protéine de fusion soluble.

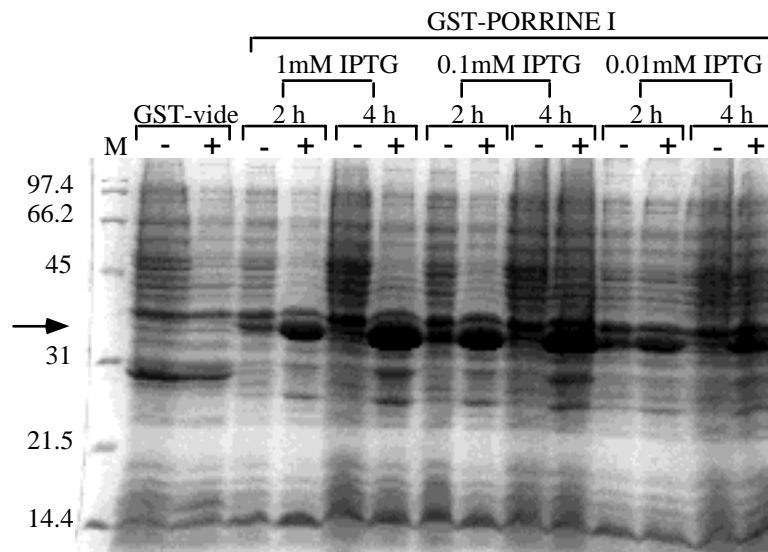


Figure 9. Analyse de la fraction insoluble des bactéries exprimant GST-vidé et GST-PORRINE I, 2 et 4 heures après induction avec différentes concentrations d'IPTG. - = bactéries non induites, + = bactéries induites. La flèche indique la position de GST-PORRINE I. Les poids moléculaires du marqueur (M) sont indiqués en kDa. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

Une solubilisation des corps d'inclusion n'a pas permis de rétablir l'activité biologique de PORRINE I

En appliquant le protocole de Worall (1997), il est possible de solubiliser une protéine de fusion imbriquée dans des corps d'inclusions, toutefois avec le risque de perdre l'activité biologique. La figure 10 illustre les différentes étapes nécessaires à la solubilisation totale de GST-PORRINE I. Après le retour probable à la conformation correcte par dialyse, les protéines ont été passées sur une colonne Glutathione Sepharose (Pharmacia Biotech), puis éluées avec du glutathione réduit (GSH), ce dernier ayant été ensuite éliminé par dialyse.

L'activité biologique a été testée en infiltrant (20 µl par point d'infiltration) la face inférieure de feuilles de *N. benthamiana* avec une concentration de 1 et 10 µg/ml de GST-PORRINE I resp. de GST-vidé. Trois jours plus tard, aucunes différences entre le contrôle et la protéine de fusion ont pu être observées. En effet, des nécroses ont été présentes tant chez le contrôle que chez la protéine de fusion (figure 11). Il est par conséquent difficile d'affirmer que les nécroses seraient dues à l'activité biologique de PORRINE I. D'autre part, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, ainsi que du GSH ont été infiltrés dans les feuilles. Le premier n'occasionnant aucuns symptômes, tandis qu'avec le second un jaunissement autour des points d'infiltration a pu être observé. Mais ces symptômes ont été nullement similaires avec ceux observés à la figure 11. Cette expérience a été répétée deux fois avec les mêmes résultats, ce qui exclut à priori une mauvaise manipulation.

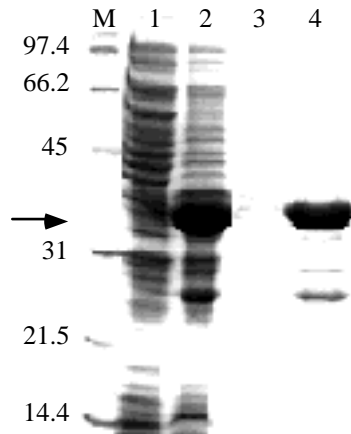


Figure 10. Illustration des différentes étapes nécessaires à la solubilisation complète de GST-PORRINE I (flèche). M: marqueur (en kDa), ligne 1: fraction soluble, ligne 2: fraction insoluble, ligne 3: lavage des corps d'inclusions avec 2M d'urée, ligne 4: solubilisation de GST-PORRINE I avec 8 M d'urée. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

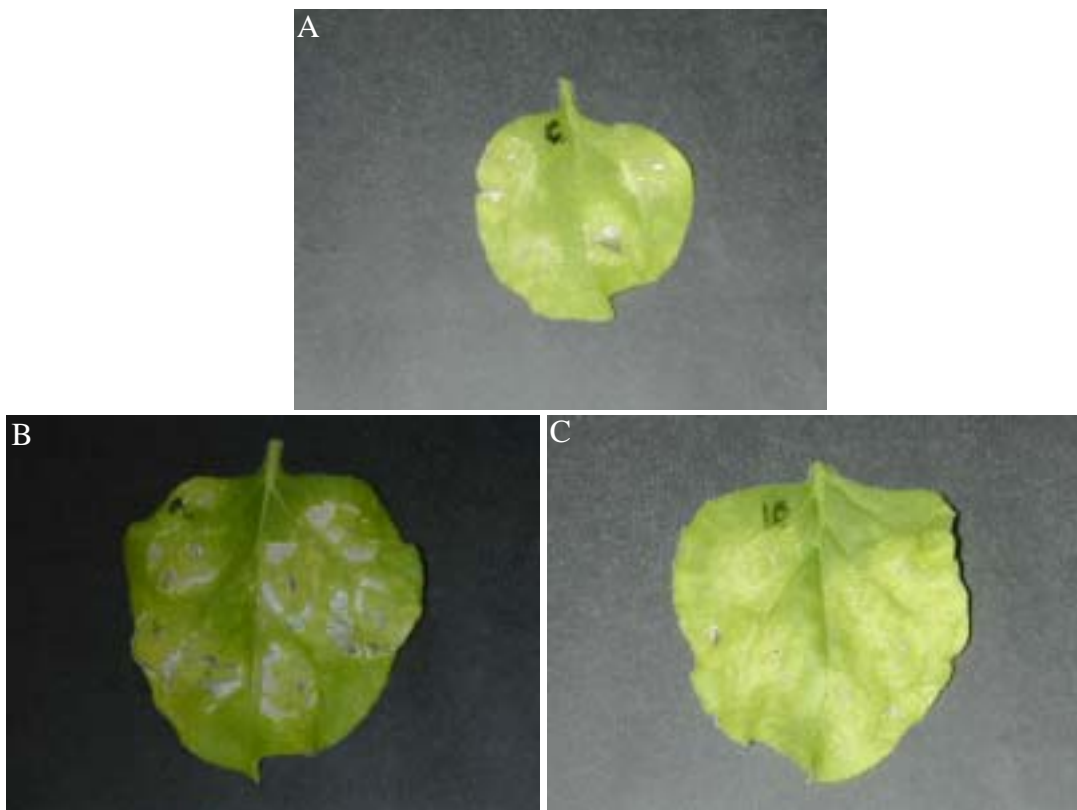


Figure 11. Symtômes observables 3 jours après infiltration de feuilles de *N. benthamiana* avec GST-PORRINE I après sa solubilisation et le retour à la conformation correcte.
 (A) Contrôle GST-vide, 1 µg/ml.
 (B) GST-PORRINE I, 1 µg/ml.
 (C) GST-PORRINE I, 10 µg/ml.

Après tous les essais et vérifications effectués, une conclusion que l'on peut tirer est qu'il doit y avoir un problème avec le vecteur d'expression lui-même car il ne devrait pas y avoir de réactions lorsqu'il est infiltré.

Transformation d'*A. thaliana*

Afin d'observer quel est l'effet de Porrine I chez *A. thaliana*, le cDNA de cette éliciteine comprenant le peptide signal (s-porrine I) a été cloné dans le vecteur pPZP111 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994). Ce vecteur binaire possède un T-DNA avec une double cassette, la première contenant un gène chimère conférant la résistance envers la kanamycine, composée du promoteur constitutif 35S du virus du chou-fleur et du terminateur NOS de la nopaline synthase ainsi que de la partie codante du gène de la néomycine phosphotransférase II. La seconde cassette contient, quant à elle, le promoteur constitutif 35S et le terminateur NOS. En insérant s-porrine I entre ces deux éléments, il est possible d'obtenir une expression constitutive de PORRINE I dans l'espace intercellulaire des cellules d'*A. thaliana* (figure 12).

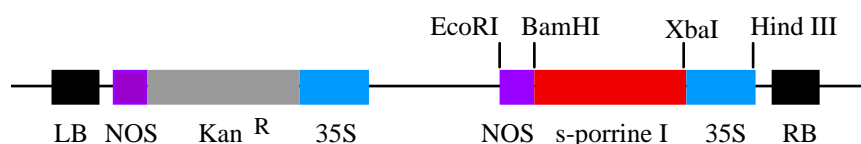


Figure 12. Illustration du T-DNA présent dans le vecteur binaire pPZP111. LB: bord gauche; RB: bord droit; 35S: promoteur constitutif du virus du chou-fleur; NOS: terminateur de la nopaline synthase; Kan^R: résistance envers la kanamycine, contenant la région codant pour la néomycine phosphotransférase II; s-porrine I: cDNA de Porrine I avec le peptide signal. EcoRI, BamHI, XbaI, HindIII: enzymes de restriction ayant servi pour le clonage.

La souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le vecteur pPZP111-s-porrine I a été utilisée pour transformer l'écotype Ler, cependant après sélection des graines, aucune plante ne s'est développée sur le milieu de sélection. Comme le même phénomène a été observé pour les graines issues de la transformation avec *A. tumefaciens* contenant le vecteur binaire vide, il y avait tout lieu de croire que le processus de transformation n'avait pas été efficace. Cette hypothèse a été confirmée par la découverte que la souche LBA4404, par ailleurs très efficace pour transformer le tabac, n'est en fait pas appropriée pour infecter *A. thaliana* (C. Nawrath, communication personnelle). Une seconde transformation a donc été effectuée, avec cette fois la souche GV3101 d'*A. tumefaciens*, qui, elle, infecte avec succès *A. thaliana* (Bechtold *et al.*, 1993) et l'écotype Col-0. Cette fois, des plantes se sont développées sur le milieu de sélection, tant chez les graines issues de la transformation avec le vecteur vide que chez celles de la transformation avec le vecteur contenant s-porrine I. Cette transformation ayant été réalisée lors des toutes dernières semaines de ce travail, la caractérisation de ces transformants n'a pas pu avoir lieu.

Une agroinfiltration de *N. benthamiana* conduit à aucuns symptômes visibles

Un autre type d'expérience impliquant *A. tumefaciens* et permettant un résultat plus rapide est l'agroinfiltration. En effet, cette méthode consiste en une infiltration d'agrobactéries dans les cellules végétales de manière à ce qu'un certain nombre de cellules autour du point d'infiltration soient transformées. Cette technique a déjà fait ses preuves chez le tabac et chez *A. thaliana* (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; De Buck *et al.*, 1998). Des feuilles de *N. benthamiana* ont donc été infiltrées avec la souche LBA4404 d'*A. tumefaciens* possédant le plasmide pPZP111-s-porrine I. Comme contrôle, le milieu d'infiltration sans bactéries a été infiltré. Après plus d'une semaine, aucuns symptômes ne sont apparus à l'endroit des infiltrations.

En parallèle, afin de vérifier l'efficacité de la méthode, la souche LBA4404 d'*A. tumefaciens* contenant le plasmide pBIMon30063 a été infiltrée de la même manière dans les feuilles de *N. benthamiana*. Ce plasmide contient une GFP avec intron placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif 35 S. La fluorescence que l'on peut observer est ainsi uniquement la conséquence de la transformation des cellules végétales par les agrobactéries et non de la présence de ces dernières dans le tissu, vu qu'elle ne peuvent épisser l'intron. Une belle fluorescence a pu être observée 5 jours après l'infiltration (figure 13), indiquant que la méthode d'infiltration est fiable.

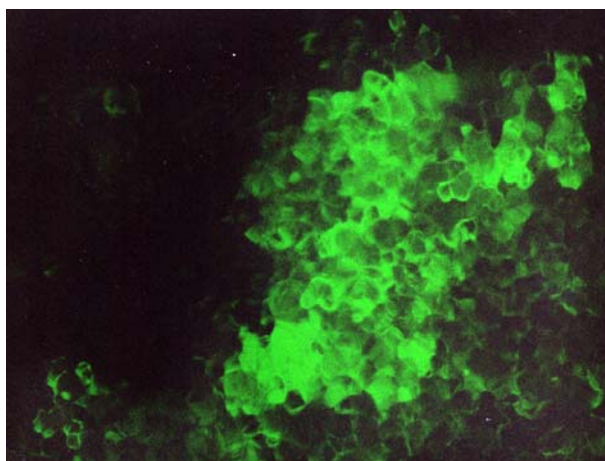


Figure 13. Illustration des cellules de *N. benthamiana* 5 jours après leur transformation par agroinfiltration. Les cellules transformées expriment la GFP et peuvent être observées à l'aide d'une loupe à fluorescence équipée d'un filtre GFP.

DISCUSSION

L'étude du contenu de filtrats de culture d'un pathogène donné constitue une approche classique pour la découverte de facteurs d'avirulence. Par exemple, lors de l'interaction entre la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et le champignon *Cladosporium fulvum*, ce dernier sécrète des glycoprotéines en culture liquide qui sont responsables de nécroses lorsqu'elles sont infiltrées dans les feuilles des divers cultivars de tomate (De Wit and Roseboom, 1980; De Wit and Kodde, 1981). Les facteurs d'avirulence connus, que ce soit dans l'interaction citée plus haut ou bien dans d'autres pathosystèmes, peuvent être regroupés dans deux catégories: ceux qui sont spécifiques à

l'hôte et ceux qui sont non-spécifiques. De manière générale, les facteurs d'avirulence qui ont été purifiés à partir de filtrats sont plutôt à placer dans la catégorie des facteurs non-spécifiques tandis que ceux isolés lors de l'interaction de l'hôte avec son pathogène sont plutôt spécifiques à cette dernière.

Dans le cas de l'interaction *A. thaliana*-*P. porri*, une étude du filtrat de l'isolat HH a permis de mettre en évidence une élicitrine, nommée Porrine I (figure 1). Cette dernière a été clonée (figures 3 et 4) et s'est révélée être une élicitrine légèrement acide, semblable aux autres élicitines que l'on a pu isoler jusqu'ici chez d'autres espèces de *Phytophthora*. Après infiltration, il a pu être démontré qu'elle est, selon toute vraisemblance, responsable de nécroses chez *N. benthamiana* alors que l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*, par ailleurs résistant à *P. porri* ne présente quasiment pas de réaction face à une infiltration tandis que l'écotype Ler, lui susceptible, réagit en présentant une nécrose sur toute la surface infiltrée (figure 2).

Lorsque les élicitines d'autres *Phytophthora*, telles la cryptogéine ou la parasiticéine sont mises en contact avec des cellules de *N. benthamiana*, que ce soit par infiltration de feuilles (Kamoun *et al.*, 1993a) ou par application sur le pétiole (Zanetti *et al.*, 1992), on remarque très rapidement (16 à 18 heures) un effet nécrosant. Dans le cas de Porrine I, ce n'est qu'au bout de 3 à 5 jours que des nécroses se sont développées. A côté du rôle de facteur d'avirulence généralement attribué aux élicitines, Heiser *et al.*, (1999) présente un autre aspect de l'effet de ces protéines. Dans cette publication, le mode d'action de trois protéines provenant de cultures liquides de divers *Phytophthora* (*P. quercina*, *P. citricola* et *P. gonapodyides*) et assimilées à des élicitines puisque reconnues par un anticorps dirigé contre ces dernières, occasionnent des symptômes sur le tabac qui se rapprochent de celui des toxines, ces derniers apparaissant 2 à 3 jours après infiltration. Porrine I ne se comporte pas comme une toxine, du moins pour le tabac mais le temps nécessaire à l'apparition des symptômes est analogue à celui décrit pour l'effet toxique. Par contre, pour *A. thaliana*, les symptômes observés tendent plus vers l'hypothèse d'une toxine ou du moins vers un facteur de virulence vu que l'on observe une réaction différentielle de la part de Col-0 et Ler.

De l'étude de Porrine I, on peut conclure qu'elle ne se démarque pas des autres élicitines décrites jusqu'ici. En effet, le gène codant pour cette élicitrine fait partie d'une famille comprenant une dizaine de copies du gène (figure 5). Ce critère de famille multigénique se retrouve chez la plupart des élicitines clonées jusqu'à présent (Kamoun *et al.*, 1993b; Le Berre *et al.*, 1994; Panabière *et al.*, 1995; Mao *et al.*, 1996) et ces dernières semblent être regroupées en un endroit dans le génome (Panabière *et al.*, 1995; Duclos *et al.*, 1998). Lors de l'étude de l'expression de porrine I *in vitro*, les résultats obtenus rejoignent ceux de Kamoun *et al.* (1997a), à savoir que cette élicitrine est exprimée uniquement dans le mycélium (figure 6). Par contre, pour ce qui concerne l'expression *in planta*, contrairement à ce qui est affirmé par Kamoun *et al.* (1997a), son expression ne semble pas être sous-régulée lors de l'interaction compatible car l'apparition du signal coïncide avec le moment où les hyphes commencent à infecter le tissu (figure 6). Alors que l'expression du gène a pu être analysée, il n'a pas été possible de détecter la protéine lors de l'infection avancée. Selon toute vraisemblance, vu le degré d'infection des feuilles, sa présence aurait dû être révélée surtout lorsque sa détection a lieu avec un anticorps. A cela trois explications peuvent être avancées; il est

possible que PORRINE I interagisse avec la surface des cellules en se fixant soit sur un récepteur, soit de manière non-spécifique, ce qui expliquerait pourquoi elle n'a pu être détectée dans le fluide intercellulaire ou dans les homogénats. La seconde explication est que la protéine, même si l'ARN messager est présent ne soit pour une raison quelconque pas traduite lorsque *P. porri* se trouve dans le tissu végétal. La troisième explication serait que la méthode d'extraction n'était pas appropriée, ceci pourrait être avancé pour les homogénats car un tampon est nécessaire pour l'extraction toutefois cette réflexion ne s'applique pas tellement à la récolte du fluide intercellulaire.

Une expression de PORRINE I sous la forme de protéine de fusion aurait permis la réalisation d'un certain nombre d'expériences. Par exemple, il aurait été intéressant de voir si PORRINE I aurait été capable d'induire une réaction systémique acquise (SAR), comme c'est le cas pour la parasiticéine (Keller *et al.*, 1996), ainsi qu'une protection subséquente envers *P. porri*. L'infiltration de la protéine de fusion aurait aussi pu se faire à grande échelle afin de chercher un mutant ne répondant pas à cette élicite, ce qui aurait ouvert la voie à des investigations plus poussées. Malheureusement, beaucoup de temps a été perdu avec les problèmes survenus lors de l'expression de PORRINE I dans *E. coli* ce qui a empêché la réalisation de ces objectifs.

Parmi les autres objectifs élaborés après le clonage du gène codant pour porrine I, il y avait l'étude de l'expression de cette élicite chez *A. thaliana*. La caractérisation des transformants n'a pas pu être réalisée dans le cadre de cette thèse mais les résultats qui en découleront se révéleront certainement très intéressants. D'autre part, une agroinfiltration a été essayée et malgré le fait que la souche d'*A. tumefaciens* utilisée ne semble pas être virulente pour *A. thaliana*, des nécroses auraient dû être visibles chez *N. benthamiana* or cela n'a pas été le cas. Ce qui soulève à nouveau plusieurs hypothèses; l'expression de PORRINE I dans l'espace intercellulaire ne conduit pas à la formation de nécroses chez *N. benthamiana*, ce qui remettrait évidemment en cause les résultats initiaux. Une autre hypothèse serait que pour une raison quelconque, Porrine I n'ait pu être sécrétée à l'extérieur des cellules, donc la protéine n'a pas pu être en contact avec un récepteur putatif et déclencher les réactions subséquentes à la formation de nécroses. Il serait aussi envisageable que la protéine reste à l'intérieur de la cellule et que son effet ne soit pas aussi toxique que ce qui était escompté. Finalement, il est aussi possible que l'élicite n'aborde pas une conformation correcte et soit de ce fait inactive.

En guise de conclusion, on peut dire que, outre sa caractérisation, plusieurs types d'expériences ont été menées en parallèle afin de pouvoir esquisser une hypothèse quant à la fonction biologique de Porrine I mais aucune n'a pu conduire à un résultat suffisamment clair. Trop de questions restent ouvertes pour que l'on puisse affirmer que cette élicite n'a aucun effet lors de l'interaction entre *A. thaliana* et *P. porri*. D'autre part, sachant que la nature, tellement bien organisée, ne conserve pas quelque chose dans son patrimoine génétique qui serait inutile et que les élicites sont des protéines relativement bien conservées, il est envisageable qu'elles jouent un rôle quelconque lors du processus d'infection. La question restant ouverte quant à savoir lequel.

METHODES

Souches de *Phytophthora porri*, maintient et culture

Des 7 isolats de *Phytophthora porri* auxquels sont fait référence, HH et II proviennent de Dr. F. Govers, University of Wageningen, The Netherlands tandis que A (=CBS 212.82), B (=CBS 180.87), C= (CBS 178.87), D (=CBS 179.87) et E (=CBS 686.95), proviennent, eux, du Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn & Delft, The Netherlands.

Les isolats ont été maintenus sur plaque de V8 20% (200 ml de jus V8 (Campbell), 800 ml d'eau distillée, 15 g d'agar et 3.5 g de CaCO₃) et repiqués au minimum une fois par mois à l'aide d'un emporte-pièce (ø 5 mm). Les plaques ont été conservées à l'obscurité et à une température de 18°C. Pour la production de zoospores, des rondelles de mycélium (ø 5 mm) prélevées sur le bord d'une colonie ont été mises en culture pendant trois jours dans du V8 10% clarifié/filtré (Erwin and Ribeiro, 1996) puis transférées dans la solution de Schmitthenner (Erwin and Ribeiro, 1996). Trois jours plus tard, la solution minérale a été remplacée par de l'eau distillée stérile froide. Deux à quatre heures ont été nécessaires pour permettre aux sporanges de libérer leurs zoospores dans l'eau froide. La suspension de zoospores a ensuite été filtrée au travers d'un filtre de nylon (ø 50 µm) et du mycélium a été obtenu à partir de ces zoospores en les plaçant dans du V8 10% clarifié. Ce dernier a été ensuite récolté à différents temps après la mise en culture, lavé avec de l'eau distillée puis réduit en poudre à l'aide d'azote liquide et conservé à -80°C.

Maintient et culture d'*Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana benthamiana*

Les écotypes d'*A. thaliana* utilisés ont été Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler) ainsi que le mutant déficient en phytoalexine, *pad2* (Glazebrook *et al.*, 1994), dont l'arrière-fond génétique est Columbia. Après avoir semé les graines sur la terre (un mélange 4:1 de terreau (Triohum Substrat 1, Mauser) et de perlite), les pots ont passé quelques jours à 4°C pour permettre la stratification des graines puis ont été placés en chambre de culture. Cette dernière ayant été réglée pour avoir une photopériode de 10 heures par cycle de 24 heures, ainsi qu'une température de 18-20°C la journée et de 16°C la nuit. L'humidité relative se situant durant la journée aux environs de 60% et de 100% durant la nuit. Une semaine après germination, les plantules ont été repiquées une par pot (ø 6 cm) et cultivées pendant trois à quatre semaines jusqu'à ce qu'elles présentent de belles rosettes.

N. benthamiana a été cultivée avec la même terre qu'*A. thaliana* à la différence que les pots ont directement été placés en chambre de culture après que les graines aient été semées. Les conditions dans la chambre de culture étaient une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures, une température durant la journée de 24 °C et de 22 °C durant la nuit. L'humidité relative se situant vers 50%. Les plantes ont été utilisées après 4 à 6 semaines de croissance.

Conditions d'inoculation d'*A. thaliana*

Pour les inoculations, des rondelles de mycélium (ø 5 mm) prélevées sur le bord d'une jeune colonie (4-5 jours) ont été placées sur la face supérieure des feuilles de rosettes âgées de 4 à 5 semaines. Les plantes contrôles ont subi le même traitement avec des rondelles de V8 20% sans

mycélium. Les inoculations ont été effectuées dans la chambre de culture en fin d'après-midi, juste avant le début de la phase d'obscurité. Durant les 14 premières heures d'infection, les caissettes ont été fermées avec de la parafilm afin d'atteindre une humidité relative de 100% à l'intérieur. Ensuite, la parafilm a été enlevée de manière à ce que l'humidité relative se situe autour de 70-80% durant toute la durée de l'infection.

Isolation des protéines sécrétées en culture liquide et infiltration de feuilles d'*A. thaliana* et *N. benthamiana*

Les différents isolats de *P. porri* ont été mis en culture (25 rondelles (ø 5 mm)) dans des boîtes stériles (Costar, 162 cm²) avec 50 ml de V8 10% liquide clarifié/filtré. Deux semaines plus tard, le liquide a été récolté, filtré au travers d'un filtre Miracloth (Calbiochem) puis au travers d'un filtre 0.22 µm (Schleicher & Schuell). Les protéines contenues dans le filtrat ont été précipitées durant la nuit à 4°C avec du (NH₄)₂SO₄ (saturation à 95%). Après centrifugation (10 000 g, 4°C, 30 min), le culot a été resuspendu dans 0.01 volume de 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, dialysé puis filtré stérilement (ø 0.22 µm) et conservé à -20°C. La quantité de protéines totales a été estimée à l'aide du test de Bradford (Biorad). Les protéines ont été chargées sur gel de Tricine (16%) (Coligan *et al.*, 1995) et visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

Les feuilles d'*A. thaliana* et de *N. benthamiana* ont été infiltrées sur leur face inférieure à l'aide d'une seringue sans aiguille. Les plantes ont partiellement été recouvertes pendant 24 heures puis le couvercle a progressivement été enlevé les jours suivants. Les symptômes macroscopiques ont été observés tout au long de la semaine qui a suivi l'infiltration.

Séquençage d'une protéine exprimée en culture liquide

Les protéines obtenues après leur précipitation ont été chargées sur gel de tricine (16%) (Coligan *et al.*, 1995). Après migration, ces dernières ont été transférées selon la méthode semi-dry (protocole fourni par Dr. Johann Schaller, Université de Berne) sur membrane PVDF (Biorad) et colorée au bleu de Coomassie. La bande d'intérêt a été découpée de la membrane et envoyée à l'Institut de Chimie et Biochimie de l'Université de Berne pour le séquençage.

Clonage de porrine I

A partir de mycélium âgé de 4 jours (obtenu après libération de zoospores), l'ARN total a été extrait selon Zimmerli *et al.*, (2000) puis purifié à l'aide du kit Oligotex (Qiagen) afin d'obtenir du poly(A)⁺. Ce dernier a été transcrit en cDNA par transcription inverse (Omniscript, Qiagen). Par PCR sur ce cDNA avec des amorces dégénérées (5'tgyacnccnacncarcacngcngcntty3') et (5'ccnacnacngcncartayaarytnatgtgy3'), créées à partir des séquences obtenues du séquençage protéique, une bande correspondant à la séquence interne de porrine I a été purifiée du gel et séquencée manuellement (Sequenase version 2.0, DNA Sequencing Kit, USB).

A partir d'ADN génomique, digéré avec différentes enzymes (BamHI, XhoI, EcoRI, SalI, PstI et HindIII) puis reliqué, une PCR inverse a été effectuée avec deux amorces spécifiques à porrine I, (5'CGTGTCCGACAGGATGCCTACGAG3') et (5'TCGCTACTCGATGCTGACGGCCAC3'), afin

d'obtenir les séquences du début et de la fin du gène. Les divers fragments obtenus ont été clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) et envoyés à séquencer.

Une PCR, avec comme matrice le même cDNA que pour la première PCR et un primer poly T (5'GAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT3') a été réalisée afin de déterminer l'extrémité 3' de porrine I. Le produit de cette PCR a été séquencé manuellement (Sequenase version 2.0, DNA Sequencing Kit, USB).

Southern Blot

A partir de mycélium des isolats HH et A âgé de 10 jours (obtenu après libération de zoospores), l'ADN a été extrait selon le protocole de Qiagen (Qiagen Genomic Tip Protocol). 4.5 µg d'ADN génomique des deux isolats ont été digérés avec les enzymes XhoI, PstI et Sall. Les échantillons ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 0.8%-TAE. Le transfert s'est effectué sur membrane Hybond-N (Amersham, Pharmacia biotech) selon la méthode décrite dans Sambrook *et al.*, (1989). La membrane de nylon a été hybridée avec le cDNA de porrine I radiomarké au ³²P (Radprime DNA Labeling System, Life technologies, Merelbeke, B).

Northern Blot

A partir de mycélium de l'isolat HH (obtenu après libération de zoospores) récolté à différents intervalles de temps après la mise en culture, l'ARN total a été extrait selon Zimmerli *et al.*, (2000) et 2 µg a été séparé sur gel d'agarose 1% contenant du formaldéhyde puis transféré sur membrane Hybond-H selon Sambrook *et al.*, (1989).

Après inoculation des plantes avec l'isolat HH, les prélèvements ont été effectués à différents points durant la période d'infection. La zone d'inoculation située juste sous la rondelle de mycélium ainsi que les 5 mm avoisinant cette zone ont été récoltés et réduits en poudre à l'aide d'azote liquide et conservés à -80°C. 15 µg de l'ARN total extrait de la poudre a été séparé sur gel d'agarose 1% contenant du formaldéhyde puis transféré sur membrane Hybond-H selon Sambrook *et al.*, (1989).

Les hybridations se sont effectuées avec le cDNA de porrine I radiomarké au ³²P (Radprime DNA Labeling System, Life technologies, Merelbeke, B).

Analyse du fluide intercellulaire (IWF)

Les feuilles infectées par l'isolat HH de *P. porri*, ainsi que les feuilles contrôle ont été récoltées à différents temps après l'inoculation. Elles ont été placées dans de l'eau distillée puis infiltrées quelques minutes sous vide. Elles ont ensuite été délicatement roulées et introduites dans des seringues, elles-mêmes placées dans des tubes de centrifugation. Après centrifugation (5 min, 1600 g), le fluide intercellulaire a été récolté au fond des tubes de centrifugation et chargé sur gel de Tricine 16% (Coligan *et al.*, 1995). Les protéines contenues dans l'IWF ont été visualisées par coloration au nitrate d'argent.

Expression de GST-PORRINE I dans *Escherichia coli*

Afin d'obtenir la séquence à insérer dans le vecteur d'expression pGEX-5X-1 (Pharmacia Biotech), une PCR réalisée avec de l'ADN génomique de HH comme matrice et des amorces spécifiques pour porrine I contenant des adaptateurs permettant de créer un site BamHI (5'GGGATCCCGTGTACCCCGACC3') à l'extrémité 5' et un site XhoI (5'AGGATCCTCGAGTGCCTGTTTAACCGCG3') à l'extrémité 3', a permis d'obtenir un fragment de 338 paires de bases. Après vérification, le clonage s'est effectué dans le vecteur d'expression, préalablement digéré en BamHI, XhoI. Le vecteur avec GST-porrine I ainsi que le vecteur GST-vidé ont été électroporés dans la souche XL1-blue d'*E. coli*. Les clones corrects ont été mis en pré-culture dans du LB (Sigma)/ampicilline (50 µg/ml). Le jour suivant, 30 µl de cette pré-culture ont été inoculés dans 3 ml de milieu frais. A une densité optique (OD₆₀₀) de 0.6, de l'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) a été ajouté (concentrations finales: 1 mM, 0.1 mM et 0.01 mM). Les bactéries induites, ainsi que leurs contrôles respectifs non-induits ont été récoltés après 2 et 4 heures. Les cultures ont été centrifugées et le culot resuspendu dans une solution de PBS (Pharmacia Biotech), auquel du lysozyme a été ajouté, et agitées pendant 1 heure à 4°C. Après passage aux ultrasons, les tubes ont été centrifugés (5 min, 14 000 rpm). Le surnageant (fraction soluble), ainsi que le culot (fraction insoluble) ont été analysés sur gel SDS-PAGE (13%) selon Sambrook *et al.*, (1989) et colorés au bleu de Coomassie.

Solubilisation des corps d'inclusion

La solubilisation de GST-PORRINE I a été effectuée selon Worrall, (1997) puis la concentration de la protéine de fusion a été ajustée à 30 µg/ml et une dialyse en deux étapes a été effectuée pour permettre à GST-PORRINE I de retrouver sa conformation correcte. La première phase de dialyse s'est faite à 4°C contre 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 4M urée et 1 mM DTT. La seconde phase s'est effectuée, toujours à 4°C, contre 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA et 1 mM PMSF. Les protéines ont ensuite passé sur une colonne de glutathione sepharose (Pharmacia Biotech), été lavées puis éluées dans 10 mM de glutathione réduit (GSH) et ce dernier a été éliminé par dialyse. La solution a été filtrée stérilement et conservée à -20°C. A noter qu'une séparation de PORRINE I de la GST n'a pas été effectuée.

Test de l'activité biologique de GST-PORRINE I

Des feuilles de *N. benthamiana*, âgées de 4 à 6 semaines, ont été infiltrées sur leur face inférieure à l'aide d'une seringue (sans aiguille) avec une concentration de 1 et 10 µg/ml de GST-PORRINE I. Comme contrôles, le vecteur vide ainsi que 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 ont été infiltrés. Pendant 24 heures, les plantes ont été partiellement recouvertes puis le couvercle a progressivement été enlevé. Les symptômes macroscopiques ont été observés tout au long de la semaine qui a suivi l'infiltration.

Expression de s-porrine I chez *A. thaliana*

Afin d'obtenir la séquence à insérer dans le vecteur binaire pPZP111 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) servant à la transformation d'*A. thaliana*, une PCR réalisée avec de l'ADN génomique de HH comme matrice et des amorces spécifiques pour s-porrine I (= élicitrine avec peptide signal) contenant des adaptateurs permettant de créer un site XbaI (5'GTCTAGACCACTCCTCCCCACTAC3') à l'extrémité 5' et un site BamHI (5'AGGATCCTCGAGTGCCTGTTTAACCGCG3') à l'extrémité 3', a permis d'obtenir un fragment de 425 paires de bases. Après vérification, le clonage s'est effectué dans le vecteur binaire, préalablement digéré en XbaI, BamHI.

Le vecteur contenant l'insert ainsi que le vecteur vide ont ensuite été électroporés dans les souches LBA4404 et GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*, la transformation des écotypes Col-0 et Ler s'est effectuée comme décrit dans Bechtold *et al.*, (1993). Les graines obtenues après transformation ont été stérilisées et étalées sur plaques de 1/2 MS (Murashige *et al.*, 1962) contenant 50 µg/ml de kanamycine.

Agroinfiltrations

Le vecteur binaire pBIMon30063 a été fourni par Felix Mauch (Université de Fribourg), il s'agit à la base du vecteur pMON30063 (Pang *et al.*, 1996) dont la cassette S35Tpgfp-intron a été excisée par digestion avec NotI et sous-clonée dans le vecteur pSportI. Ce dernier a ensuite été partiellement digéré avec HindIII/EcoRI de manière à pouvoir extraire à nouveau la cassette, qui a finalement été insérée dans le vecteur binaire pBI121, lui-même préalablement digéré en HindIII/EcoRI.

Les clones de la souche LBA4404 d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur binaire pPZP111-s-porrine I ainsi que ceux contenant le vecteur binaire pBIMon30063 ont été préparés selon Van den Ackerveken *et al.*, (1996). Les feuilles d'*A. thaliana* et de *N. benthamiana* ont été infiltrées sur leur face inférieure à l'aide d'une seringue sans aiguille. Comme contrôle, le milieu d'infiltration a été infiltré. *N. benthamiana* a été transférée pour les 48 premières heures à 20°C puis les plantes ont été replacées dans leur chambre de culture habituelle. Les plantes ont été couvertes pendant 48 heures puis le couvercle a progressivement été enlevé les jours suivants. Les observations pour les agroinfiltrations avec pBIMon30063 ont été effectuées à l'aide d'une loupe à fluorescence (Leica, MZFL IV, Fluo II) équipée d'un filtre GFP.

CONCLUSION GENERALE

L'étude de certains aspects de l'interaction entre *A. thaliana* et *P. porri* et les résultats découlant des diverses expériences effectuées permettent de présenter quelques suggestions quant aux différentes voies de biosynthèse impliquées au cours du processus d'infection. Le décryptage des voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène étant en constante progression, beaucoup de modèles sont proposés et se retrouvent aussi très rapidement contestés par de nouvelles découvertes. La figure 1 illustre un modèle adapté de Glazebrook (1999) et dans lequel les données relatives au pathosystème *A. thaliana*-*P. porri* récoltées au cours de ce travail de recherche ont été intégrées.

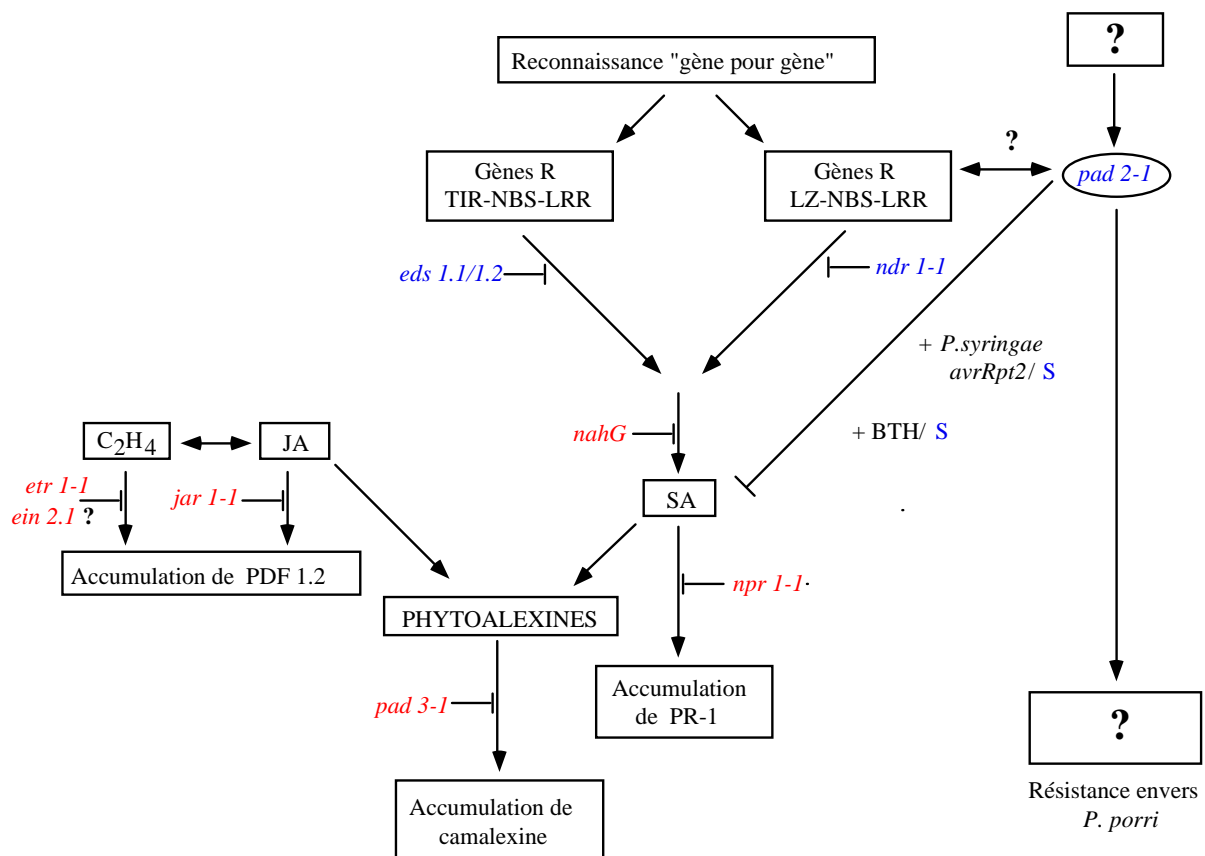


Figure 1. Schéma adapté de Glazebrook (1999) avec l'intégration des données récoltées au cours du présent travail. Le phénotype des différents mutants à l'issue des inoculations avec *P. porri* est indiqué en couleurs. Rouge: résistant, bleu: susceptible. Le mutant *pad2* est placé au centre d'une voie, encore inconnue, qui régit les mécanismes de défense envers *P. porri*. Cette dernière a peut être une implication dans premières étapes des mécanismes de reconnaissance "gène pour gène" comme l'indique la flèche surmontée d'un point d'interrogation. *Pad2* est aussi empêché dans la voie de l'acide salicylique, comme il a pu être montré lors de la caractérisation biochimique et moléculaire. D'autre part, il n'est pas possible chez ce mutant d'induire une résistance systémique acquise comme l'ont démontré les expériences avec le BTH et la bactérie *P. syringae* portant le gène d'avirulence *avrRpt2* car le phénotype est resté susceptible (S). Un point d'interrogation est aussi placé à l'encontre du mutant *ein 2.1* car ce dernier est sensé, selon la littérature, ne pas produire de PDF 1.2 alors que cela a été le cas lors des présentes expériences.

Grâce aux nombreux mutants d'*A. thaliana* disponibles il est désormais possible d'avancer pas à pas dans les différentes voies de biosynthèse. De l'analyse de neuf mutants présentés dans ce travail, trois mutants ont exprimé des symptômes clairs de susceptibilité, à savoir *pad 2-1* (phytoalexin deficient), *ndr 1-1* (non race-specific disease resistance) et *eds 1.1* (enhanced disease susceptibility). Ces deux derniers mutants ont une place définie dans la figure 1 car ils ont été établis comme étant des mutants des voies de signalisation situées en aval du processus de reconnaissance R-Avr. Il n'en va pas de même pour *pad2*, en effet, à l'heure actuelle, on ne sait trop où le placer. Ce mutant est le seul des 5 mutants déficitaires en camalexine testés, à savoir *pad 1-1*, *pad 2-1*, *pad 3-1*, *pad 4-1* et *pad 5-1*, qui a présenté des symptômes d'extrême susceptibilité envers *P. porri* alors que les autres mutants ont présenté de la résistance. Cette phytoalexine est par ailleurs très rapidement induite lors de l'infection, que ce soit chez les plantes inoculées ou chez les contrôles, ce qui indique que ce composé fait certainement partie du mécanisme de défense que l'on pourrait qualifier de général envers les pathogènes, elle ne semble toutefois pas être spécifique à *P. porri*. *Pad3* a été établi comme étant un vrai mutant de biosynthèse de la camalexine, ce qui ne semble pas être le cas pour les quatre autres (Zhou *et al.*, 1999); *pad4*, lui, fonctionne en amont de l'acide salicylique (Zhou *et al.*, 1998) et *pad1*, *pad2* et *pad5* présentent une mutation qui semble avoir un effet pléiotrope (Glazebrook *et al.*, 1997). En ce qui concerne *pad2*, ce dernier est clairement empêché dans la voie de l'acide salicylique que ce soit ou non à l'issue de l'infection par *P. porri*. Il n'est par ailleurs aussi pas possible d'induire une réaction systémique acquise (SAR) chez ce mutant. La mutation semble ainsi jouer un rôle important dans les mécanismes de défense envers cet Oomycète et il serait intéressant d'analyser s'il y a une relation entre *pad2* et *pad4*. Une mesure du contenu en acide salicylique de *pad4* suite à l'infection par *P. porri* pourrait déjà donner quelques indications. A noter que les 7 différents isolats de *P. porri* ont été testés sur *pad2* et que tous se sont révélés extrêmement virulents. D'autre part, *P. infestans* et deux isolats de *P. megasperma*, pathogènes pour des Brassicacées, ont aussi été mis en contact avec *pad2* et aucun symptôme de susceptibilité n'a été observé, ce qui indique que la mutation affectant *PAD2* est vraiment spécifique à *P. porri*. Le clonage du gène codant pour *PAD2* permettra sans doute d'apporter un élément de réponse.

Selon les résultats obtenus lors de l'analyse de *ndr 1-1* et *eds 1.1* et comme ces deux mutants sont donnés comme étant mutuellement exclusifs (Aarts *et al.*, 1998), il y a tout lieu de penser qu'il est nécessaire d'y avoir plus d'un gène de résistance pour que *P. porri* soit stoppé; cela dit d'autres expériences seront nécessaires pour prouver ces affirmations. Il est aussi envisageable que les deux voies de reconnaissance fassent tronc commun à partir d'un certain moment et que *NDR1* et *EDS1* se trouvent proches du point de réunion, ce qui expliquerait leur susceptibilité envers *P. porri*. L'inoculation d'autres mutants impliqués dans le mode de reconnaissance R-Avr tels *dnd1* (def ense no de ath), qui ne réalise pas de réaction hypersensible (Yu *et al.*, 1998) ou encore *lsd1* (les ion sim ul at ing d is e as e res ist an ce) qui forme des lésions en l'absence de pathogène (Dietrich *et al.*, 1994) pourrait par ailleurs se révéler intéressante.

En ce qui concerne le résultats de l'inoculation des mutants des trois autres voies de biosynthèse, on peut dire que ces dernières semblent a priori n'avoir que peu d'influence sur le ou les processus conduisant à l'établissement de l'état résistant envers *P. porri*. En effet, les mutants de

la voie de l'acide salicylique, à savoir la plante transgénique *nahG* (qui dégrade l'acide salicylique en catechol) et le mutant *npr 1-1* (non-PR-1 expresser) ont vu leur phénotype se déplacer légèrement vers la susceptibilité mais restent toutefois résistants. La voie de l'acide jasmonique est quant à elle fortement induite lors des interactions compatibles et incompatibles, toutefois le mutant de cette voie testé, *jar 1-1* (jasmonate résistant), s'est révélé résistant, avec un phénotype intéressant, à savoir une déposition importante de callose aux endroits où *P. porri* a tenté d'entrer dans le tissu végétal. De l'analyse biochimique, on notera la faible induction d'acide jasmonique lors de l'interaction incompatible entre l'écotype Col-0 et l'isolat HH, quant bien même il y a eu une expression du gène *PDF 1.2*, qui est un marqueur pour cette voie. De manière similaire, bien qu'enclenchée cette voie ne semble pas être la composante majeure du mécanisme de résistance. L'analyse d'un autre mutant de la voie de l'acide jasmonique, c'est-à-dire *coi1* (coronatine insensitive), peut se révéler nécessaire. La dernière voie à avoir été étudiée étant celle de l'éthylène, là aussi les deux mutants empêchés dans la perception de ce gaz, à savoir *etr 1-1* (ethylene receptor) et *ein 2.1* (ethylene insensitivity), se sont révélés résistants. Les mesures d'éthylène effectuées pour Col-0, Ler et *pad2* après une inoculation avec l'isolat HH n'ont pas révélé une production élevée de ce gaz en début d'infection alors que cela a été le cas en fin de période d'infection lors des interactions compatibles. Ceci est à mettre en rapport avec la destruction progressive du tissu et non avec une induction visant à freiner le processus d'infection. A noter cependant les résultats quelque peu contradictoires obtenus quant à l'induction de *PDF 1.2* chez *ein 2.1* lors de la caractérisation moléculaire, alors que ce mutant est décrit comme totalement empêché dans la voie de signalisation conduisant à l'expression de *PDF 1.2* (Penninckx *et al.*, 1998).

Ainsi, en guise de conclusion pour la caractérisation biochimique et moléculaire des différentes voies de signalisation présentes chez *A. thaliana*, on peut dire que l'événement clef déterminant l'état résistant ou susceptible envers *P. porri* doit se situer au début de la chaîne de transduction du signal vu que, sur la base des résultats obtenus, les éléments se situant en aval de ces voies de signalisation n'ont que peu d'influence sur le phénotype.

Quant au dernier chapitre qui traite de l'isolation de Porrine I, il est un peu difficile de tirer des conclusions quant à la fonction biologique de cette élicitrine lors de l'interaction, vu que les expériences qui ont suivi son clonage n'ont pas abouti sur des résultats très concrets. Ceci dit, l'analyse des plantes transgéniques d'*A. thaliana* exprimant Porrine I constitutivement dans l'espace intercellulaire pourra sans doute donner des indications intéressantes. D'autres expériences sont toutefois envisageables avec le matériel disponible, comme par exemple une analyse de l'expression du promoteur de Porrine I, qui pourrait être effectuée en le fusionnant à un gène reporteur et en transformant *P. porri* avec cette construction. Ou bien essayer de supprimer l'expression de cette élicitrine, afin de voir s'il y a un changement de phénotype lors des infections.

En guise de conclusion finale, on peut dire que le travail de débroussaillage inhérent à tout nouveau système a été effectué et les premiers jalons de ce pathosystème ont été posés. Les perspectives concernant cette interaction sont très vastes et grâce aux progrès incessants des techniques de biologie moléculaire, de plus en plus de nouveaux outils seront disponibles. Par les comparaisons effectuées avec *Peronospora parasitica*, il est évident que l'interaction entre *A. thaliana*

et *P. porri* est régie par des mécanismes différents. Ainsi, au sein d'une même classe de pathogènes, alors que l'on pourrait penser que ces derniers appliquent les mêmes stratégies, on se rend compte que beaucoup de mécanismes sont différents, ce qui assure encore une certaine quantité de travail pour le futur.

LITTERATURE

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B., Daniels, M.J., and Parker, J.E. (1998). Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10306-10311.
- Abel, S., Nguyen, M.D., Chow, W., and Theologis, A. (1995). ACS4, a primary indole acid responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19093-19099.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W., and Salveit, M.E. (1992). Ethylene in plant biology, 2nd edition edn, San Diego, Academic Press.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddix, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E., and Ryals, J. (1993). Increased tolerance to oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7327-7331.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology. John Wiley and Sons, INC, New York.
- Al-Kherb, S.M., Fininsa, C., Shattock, R.C., and Shaw, D.S. (1995). The inheritance of virulence of *Phytophthora infestans* to potato. *Plant Pathol.*, **44**, 552-562.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Feldmann, K.A., and Ecker, J.R. (1999). *EIN2*, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, 2148-2152.
- Anderson, T.R., and Buzzell, R.I. (1992). Inheritance and linkage of the *Rps7* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean. *Plant Dis.*, **76**, 958-959.
- Andresen, I., Becker, W., Schluter, K., Burges, J., Parthier, B., and Apel, K. (1992). The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced protein of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol. Biol.*, **19**, 193-204.
- Baker, B., Zambryki, P., Staskawicz, B., and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). *Science*, **276**, 726-733.
- Barr, D. (1992). Evolution and kingdom of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia*, **84**, 1-11.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). *In planta* Agrobacterium mediated gene transfert by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris, life science*, **316**, 1194-1199.
- Bell, E., and Mullet, J.E. (1995). Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.*, **230**, 456-462.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, Leung, J., and Staskawicz, B.J. (1994). *Science*, **265**, 1856-1860.
- Bhat, R.G., and Schmitthenner, A.F. (1993). Genetic crosses between physiologic races of *Phytophthora sojae*. *Exp. Mycology*, **17**, 122-129.
- Bleecker, A., and Kende, H. (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **241**, 1086.
- Boccas, B. (1976). La reproduction sexuée chez les *Phytophthora* hétérothalliques. Ses voies et quelques-unes de ses conséquences génétiques. *Cah. ORSTOM Ser. Biol.*, **11**, 129-133.
- Bonnet, P., Lacourt, I., Venard, P., and Ricci P. (1994). Diversity in pathogenicity to tobacco and in elicitor production among isolates of *Phytophthora parasitica*. *J. Phytopathol.*, **141**, 25-37.

- Botella, M.A., Parker, J.E., Frost, L.N., Bittner-Eddy, P.D., Beynon, J.L., Daniels, M., Holub, E.B., and Jones, J.D.G.** (1998). Three genes of the Arabidopsis *RPP1* complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell*, **10**, 1847-1860.
- Bourke, A.** (1991). Potato blight in Europe in 1845. In: The scientific controversy, *Phytophthora*. Lucas, J., Shattock, RC, Shaw, DS, Cooke, LR., eds, Cambridge, Cambridge University Press: 12-24.
- Brasier, C., and Sansome, E.** (1975). Diploidy and gametangial meiosis in *Phytophthora cinnamomi*, *P. infestans*, and *P. drechsleri*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **65**, 49-65.
- Browne, L.M., Conn, K.L., Ayer, W.A., and Tewari, J.P.** (1991). The camalexins: new phytoalexins produced in the leaves of *Camelina sativa* (Cruciferae). *Tetrahedron*, **37**, 3909-3914.
- Buzzell, R.I., and Anderson, T.R.** (1992). Inheritance and race reaction of a new soybean Rps1 allele. *Plant Dis.*, **76**, 600-601.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X.N.** (1994). Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Century, K.S., Holub, E.B., and Staskawicz, B.J.** (1995). NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6597-6601.
- Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E., and Staskawicz, B.J.** (1998). NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science*, **278**, 1963-1965.
- Clarke, J., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., and Dong, X.N.** (2000). Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in cpr-induced resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**, 2175-2190.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.M., and Wingfield, P.T.** (1995). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. In: Current protocols in Protein Science, John Wiley and Sons, Inc, pp. 10.1.1-10.1.33.
- Conn, K., L., Tewar, J.P., and Dahiya, J.S.** (1988). Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin elicitation in rapeseed and other crucifers. *Plant Sci.*, **56**, 21-25.
- 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.** (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4114-4119.
- Crute, I.R.** (1991). From breeding to cloning (and back again?): a case study with lettuce downy mildew. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **30**, 485-506.
- Crute, I., Beynon, J., Dangl, J., Holub, E., Mauch-Mani, B., Slusarenko, A., Staskawicz, B., and Ausubel, F.** (1994). Microbial pathogenesis of *Arabidopsis*. In: *Arabidopsis*, E.M. Meyerowitz, and Somerville, C.R., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 705-745.
- Crute, I.R., and Pink, A.C.** (1996). Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant Cell*, **8**, 1747-1755.
- Darvill, A.G., and Albersheim, P.** (1984). Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 243-275.

- De Buck, S., Jacobs, A., van Montagu, M., and Depicker, A.** (1998). *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **11**, 449-457.
- De Cock, A.W.A.M., Neuvel, A., Bahnweg, G., De Cock, J.C.J.M., and Prell, H.H.** (1992). A comparison of morphology pathogenicity and restriction fragment patterns of mitochondrial DNA among isolates of *Phytophthora porri* Foister. *Neth. J. Plant Pathol.*, **98**, 277-289.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Venooij, 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 disease resistance. *Science*, **266**, 1247-1250.
- Delaney, T., Friedrich, L., and Ryals, J.** (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6602-6606.
- De Wit, P.J.G.M., and Roseboom, P.H.M.** (1980). Isolation, partial characterization and specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates, mycelium and cell walls of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 391-408.
- De Wit, P.J.G.M., and Kodde, E.** (1981). Further characterization and cultivar-specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates and cell walls of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.*, **18**, 297-314.
- De Wit, P.J.G.M.** (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Sciences*, **2**, 452-458.
- Dick, M.W.** (1990). Phylum Oomycota. In: Handbook of Protoctista, Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., and Chapman, D.J., eds., Jones and Barlett, Boston.
- Dick, M.** (1995). The Straminipilous Fungi: A new classification for the biglagellate fungi and their uniflagellate relatives with particular reference to Lagenidiaceae Fungi, C.A.B. International Mycological Papers No. 168.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.J., Ryals, J.A., and Dangl, J.L.** (1994). Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell*, **77**, 565-578.
- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 316-323.
- Duclos, J., Fauconnier, A., Coelho, A-C., Bollen, A., Cravador, A., and Godfroid, E.** (1998). Identification of an elicitor gene cluster in *Phytophthora cinnamomi*. *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping*, **9**, 231-237.
- Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H.** (1997). ESTs reveal a multigene family for plant defensins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **400**, 168-172.
- Erwin, D.C., and Ribeiro, O.K.** (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, Minnesota.
- Essenberg, M., Pierce, M.L., Hamilton, B., Cover, E.C., Scholes, V.E., and Richardson, P.E.** (1992). Development of fluorescent hypersensitively necrotic cells containing phytoalexins adjacent to colonies of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **31**, 85-99.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1999). *EDS1*, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3292-3297.

- 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.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **9**, 275-298.
- Foister, C.E.** (1931). The white tip disease of leeks and its causal fungus, *Phytophthora porri* n.sp. *Tans. Bot. Soc. Edin.*, **30**, 257-281.
- Förster, H., Coffey, M.D., Elwood, H., and Sogin, M.L.** (1990). Sequence analysis of the small subunit RNAs of three zoosporic fungi and implication for fungal evolution. *Mycologia*, **82**, 306-312.
- Francis, D., and St. Clair, D.A.** (1993). Outcrossing in the homothallic oomycete *Pythium ultimum* detected with molecular markers. *Curr. Genet.*, **24**: 100-106.
- Fry, W.E., and Goodwin, S.B.** (1997). "Resurgence of the Irish potato famine fungus." *Bioscience*, **47**, 363-371.
- 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.
- Geeson, J.D.** (1976). Storage rot of white cabbage caused by *Phytophthora porri*. *Plant Pathol.*, **25**, 115-116.
- Gianinazzi, S., and Ahl, P.** (1983). "The genetic and molecular basis of b-proteins in the genus *Nicotiana*." *Neth. J. Plant Pathol.*, **89**, 275-281.
- Glazebrook, J., and Ausubel, F.M.** (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8955-8959.
- Glazebrook, J., Zooki, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., and Ausubel, F.M.** (1997). Phytoalexin-deficient mutants of arabidopsis reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics*, **146**, 381-392.
- Glazebrook, J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 280-286.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckove, U., Kogel, K.H, Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessman, H., and Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, **8**, 629-643.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, E., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (1995). *Science*, **269**, 843-846.
- Gregory, P.** (1983). Some major epidemics caused by *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its Biology, Ecology, and Pathology*. Erwin, D., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., eds, St. Paul, Minnesota, APS. pp: 271-278.
- 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*, **89**, 2389-2393.
- Guzman, P., and Ecker, J.R.** (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, **2**, 513-523.

- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., and Maliga, P.** (1994). The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 989-994.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K.M., and Jones, J.D.G.** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **48**, 575-607.
- Heimann, M.F.** (1994). First report of *Phytophthora* rot of cabbage caused by *Phytophthora porri* Foister in Wisconsin. *Plant Dis.*, **78**, 1123.
- Heiser, I., Fromm, J., Giefing, M., Koehl, J., Jung, T., and Osswald, W.** (1999). Investigations on the action of *Phytophthora quercina*, *P. citricola* and *P. gonapodyides* toxins on tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 73-81.
- Hickman, C.J.** (1943). Shanking, a new disease of onion and shallot. *Gard. Chron.*, **114**, 140.
- Ho, H.H.** (1983). *Phytophthora porri* from stored carrots in Alberta. *Mycologia* **75**, 747- 751.
- Holub, E.B., Beynon J.L., and Crute I.R.** (1994). Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **7**, 223-239.
- Huet, J-C., Nespoulous, C., and Pernollet, J-C.** (1992). Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry*, **31**, 1471-1476.
- Huet, J-C., Salletourne, M., and Pernollet, J-C.** (1994). Amino acid sequence and toxicity of the alpha elicitin secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **7**, 302-304.
- Illot T.W., Hulbert, S.H., and Michelmore R.W.** (1989). Genetic analysis of the gene-for-gene interaction between lettuce (*Lactuca sativa*) and *Bremia lactucae*. *Phytopathology*, **79**, 888-897.
- Johnston, A., and Booth, C.** (1968). Plant Pathologist's Pocketbook. Slough, England, Commonwealth Mycological Institute.
- Judelson, H.S., Tyler B.M., and Michelmore R.W.** (1991). Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **4**, 602-607.
- Judelson, H.S.** (1996). Recent advances in the genetics of oomycete plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **9**, 443-449.
- Kamoun, S., Young, M., Glascock, C.B., and Tyler, B.M.** (1993a). Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **6**, 15-25.
- Kamoun, S., Klucher, K.M., Coffey, M.D., and Tyler, B.M.** (1993b). A gene encoding a host specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **6**, 573-580.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., de Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G.A.A., and Govers, F.** (1997a). A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**, 13-20.
- Kamoun, S., Lindqvist, H., and Govers, F.** (1997b). A novel class of elicitin-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**, 1028-1030.
- Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V.G.A.A., de Groot, K.E. 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., Huitema, E., and Vleeshouwers, V. G. A. A.** (1999). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends in Plant Science*, **4**, 196-200.
- Katsura, K., Isaka, M., and Miyagishi, M.** (1969). *Phytophthora porri* Foister, the causal fungus of leaf blight and bulb rot of scallion, *Allium bakeri* Regel. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **35**, 55-61.
- Keen, N.T.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 447-463.
- Keller, H., Blein, J.P., Bonnet, P., and Ricci, P.** (1996). Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol.*, **110**, 365-376.
- Kende, H.** (1993). Ethylene biosynthesis. *Ann. Rev. Physiol. Mol. Biol.*, **44**, 283-307.
- Keogh, R.C., Deverall, B.J., and McLoad, S.** (1980). Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybeans. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **74**, 329-333.
- Koch, E., and Slusarenko A.** (1990). Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell*, **2**, 437-445.
- Kouyeas, H.** (1977). Two new hosts of *Phytophthora porri* Foister. *Ann. Instit. Phytopath. Benaki*, **11**, 357-360.
- Kuc, J.** (1995). Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**, 275-297.
- Lamb, C.J.** (1994). Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell*, **76**, 419-422.
- 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.
- Le Berre, J-Y., Panabières F., Ponchet, M., Denoroy L., Bonnet, P., Marais, A., and Ricci, P.** (1994). Occurrence of multiple forms of elicitors in *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol. Biochem.*, **32**, 251-258.
- Lebrun-Garcia, A., Bourque, S., Binet, M-N., Ouaked, F., Wendehenne, D., Chilz, A. Schaffner, A., and Pugin, A.** (1999). Involvement of plasma membranes proteins in plant defense response: analysis of the cryptogin signal transduction in tobacco. *Biochimie*, **81**, 663-668.
- Lee, H. I., Leon, J., and Raskin, I.** (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4076-4079.
- Legge, B.** (1951). A *Phytophthora* crown rot of Campanula. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **34**, 293-303.
- Liang, X., Abel, S., Keller, J.A., Shen, N.F., and Theologis, A.** (1992). The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11046-11050.
- Lister, C., and Dean, C.** (1993). Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **4**, 745-750.
- Long, M., Barton-Willis, P., Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., and Keen, N.T.** (1985). Further studies on the relationship between glyceollin accumulation and the resistance of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Phytopathology*, **75**, 235-239.

- MacLean, D.J., and Tommerup, I.C.** (1979). Histology and physiology of compatibility and incompatibility between lettuce and the downy mildew fungus, *Bremia lactucae* Regel. *Physiol. Plant Pathol.*, **14**, 291-312.
- Mao, Y.X., and Tyler, B.M.** (1996). Cloning and sequence analysis of elicitor genes of *Phytophthora sojae*. *Fungal Genet. Biol.*, **20**, 169-172.
- Martin, G.B.** (1999). Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 273-279.
- Mattoo, A.K., and Suttle, J.C.** (1991). The plant hormone ethylene. Boca Raton, CRC Press.
- Mauch-Mani, B., and Métraux, J.P.** (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, **82**, 535-540.
- Mauch-Mani, B., and Slusarenko, A.J.** (1994). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by a predisposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **7**, 378-383.
- McDowell, J.M., Dhandaydham, M., Long, T. A., Aarts, M.G.M., Goff, S., Holub, E.B., and Dangl, J.L.** (1998). Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1861-1874.
- McDowell, J.M., Cuzick, A., Can, C., Beynon, J., Dangl, J.L., and Holub, E.B.** (2000). Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in *Arabidopsis* vary in functional requirements for NDR1, EDS1, NPR1 and salicylic acid accumulation. *Plant J.*, **22**, 523-529.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlbur, P., and Janeway, C.A.** (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.
- Meuwly, P., and Métraux J-P.** (1993). Ortho-anisic acid as an internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber plants. *Anal. Biochem.*, **214**, 500-505.
- 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.
- Mikes, V., Milat, M-L., Ponchet, M., Panabièrre, F., Ricci, P., and Blein, J-P.** (1998). Elicitins secreted by *Phytophthora* are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **245**, 133-139.
- Milat, M-L., Ducruet, J-M., Ricci, P., Marty, F., and Blein, J-P.** (1991). Physiological and structural changes in tobacco leaves treated with cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathol.*, **81**, 1364-1368.
- Mindrinis, M., Katagiri, F., Yu, G-L., and Ausubel, F.M.** (1994). The *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, **78**, 1089-1099.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Nawrath, C., and Métraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*, **11**, 1393-1404.
- Nespoulous, C., Huet, J-C., and Pernollet, J-C.** (1992). Structure-function relationships of a and b-elicitor, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta*, **186**, 551-557.

- Panabière, F., Marais, A., Le Berre, J.Y., Penot, I., Fournier D., and Ricci, P.** (1995). Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**, 750-760.
- Pang, S-Z., De Boer, D., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, M. K., Armstrong C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A., and Fromm, M.E.** (1996). An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.*, **112**, 893-900.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., and Daniels, M.J.** (1996). Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell*, **8**, 2033-2046.
- Parker, J.E., Coleman, M.J., Szabò, V., Frost, L.N., Schmidt, R., Van der Biezen, E.A., Moores, T., Dean, C., Daniels, M.J., and Jones, J.D.G.** (1997). The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell*, **9**, 879-894.
- Patterson, D.J.** (1989). Stramenopila: Chromophytes from a Protistan Perspective. In: The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives. Green, J.C., Leadbeater, B.S.C., and Diver, W.L., eds, Oxford, UK, Clarendon, pp: 357-379.
- 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 a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**, 2309-2323.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Métraux, J.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 2103-2113.
- Pieterse, C.M.J., Risseuw, E.P., and Davidse, L.C.** (1991). An in planta induced gene of *Phytophthora infestans* codes for ubiquitin. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 799-811.
- Ponchet, M., Panabière, F., Milat, M-L., Mikes, J-L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y., and Blein, J-P.** (1999). Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci*, **56**, 1020-1047.
- Rate, D.N., Cuence, 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 the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defense, and cell growth. *Plant Cell*, **11**, 1695-1708.
- Reuber, T.L., Plotnikova, J.M., Dewdney, J., Rogers, E.E., Wood, W., and Ausubel, F.M.** (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J.*, **16**, 473-485.
- Ribeiro, O.K.** (1978). A source book of the genus *Phytophthora*. Vaduz, A.R. Gantner Verlag K.-G.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J-C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Brunneteau, M., Billard, V., Michel, G., and Pernollet, J-C.** (1989). Structure and activity of protein from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance. *Eur. J. Biochem.*, **183**, 555-563.
- Ricci, P., Trentin, F., Bonnet, P., Venard, P., Mouton-Perronnet, F., and Bruneteau, M.** (1992). Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathol.*, **41**, 298-307.
- Rodrigues-Pousada, R.A., De Rycke, R., Dedonder, A., van Caeneghem, W., Engler, G., van Montagu, M., and Van der Streaten, D.** (1993). The *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 is expressed during early development. *Plant Cell*, **5**, 897-911.

- Roetschi, A.** (1997). *Arabidopsis-Phytophthora*: un nouveau pathosystème. Travail de diplôme, Université de Fribourg.
- Ross, A.F.** (1961). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*, **14**, 329-339.
- Rustérucci, C., Montillet, J-L., Milat, M-L., Pugin, A., Ricci, P., and Blein, J-P.** (1996). Relationships between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.*, **111**, 885-891.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*.
- Schmitthenner, A.F.** (1985). Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Disease*, **69**, 362-368.
- Semb, L.** (1971). A rot of stored cabbage caused by *Phytophthora* sp. *Acta Hort.*, **20**, 32-35.
- Sembdner, G., and Parthier, B.** (1993). The biochemistry and physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**, 569-589.
- Shah, J., Kachroo, P., and Klessig, D.F.** (1999). The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin expression salicylic acid dependent. *Plant Cell*, **11**, 191-206.
- Shaw, C.G.** (1981). Taxonomy and Evolution. In: *The downy mildews*. Spencer, D.M. ed, Academic Press, New York, pp. 19-29.
- Shen, K.K., Meyers, B.C., Islam-Faridi, M.N., Chin, D.B., Stelly, D.M., and Michelmore, R.W.** (1998). Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **11**, 815-823.
- Smith, M.M., and McCully, M.E.** (1978). Enhancing aniline blue fluorescent staining of cell wall structures. *Stain Technol.*, **53**, 79-85.
- Smith, D.** (1982). Liquid nitrogen storage of fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **79**, 415-421.
- Spielman, M., McMaster, B.J., and Fry, W.E.** (1989). Dominance and recessiveness at loci for virulence against tomato and potato in *Phytophthora infestans*. *Theo. Appl. Genet.*, **77**, 832-838.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., and Jones, J.D.G.** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, **268**, 661-667.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6837-6840.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., and Lejman, C.C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.*, **15**, 747-754.
- Stelfox, D., and Henry, A.W.** (1978). Occurrence of the rubbery brown rot of stored carrots in Alberta. *Can. Plant Dis. Surv.*, **58**, 87-91.
- Tercé-Laforgue, T., Huet, J-C., Pernollet, J-C.** (1992). Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol.*, **98**, 936-941.
- Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K., and Broekaert, W.F.** (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J.*, **19**, 163-171.

- Tooley, P.W., and Therrien, C.D. (1987). Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans*. *Exp. Mycol.*, **11**, 19-26.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., and Sommerville, S.C. (1992). Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.*, **98**, 1304-1309.
- Tyler, B., Förster, H., and Coffey, M.D. (1995). Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 515-523.
- Uknes, S., Mauch-Mani, M., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **4**, 645-656.
- Uknes, S., Winter, A., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., and Ryals, J. (1993). Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **6**, 692-698.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U. (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, **87**, 1307-1316.
- Van den Straeten, D., Rogrigues-Pousada, R.A., Villarroel, R., Hanley, S., Goodman, H.M., and van Montagu, M. (1992). Cloning, gene mapping, and expression analysis of an *Arabidopsis thaliana* gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylase synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9969-9973.
- Van Loon, L.C., and Van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun" and "Samsun NN'II". Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, **40**, 199-211.
- Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M-L., Ponchet, M., Maume, B., Osman, H., and Blein, J-P. (1999). Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1419**, 335-342.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kloditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann H., and Ryals, J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal response for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, **6**, 959-965.
- Vijayan, 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.
- Wahlen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F., and Staskawicz, B.J. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, **3**, 49-59.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.L., Ahl-Goy, P., Métraux, J-P., and Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **3**, 1085-1094.
- Whisson, S.C., Drenth, A., Maclean, D.J., and Irwin, J.A. (1994). Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of a DNA marker to two avirulence genes. *Curr. Genet.*, **27**, 77-82.

- Worrall, D.M.** (1997). Extraction of recombinant protein from bacteria. *Methods in molecular biology*, S. Doonan, ed., Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 31-37.
- Xu, Y., Chang, P-F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Ragothama, 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.
- Yu, L.M.** (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4088-4094.
- Yu, I-C., Parker, J., and Bent, A.F.** (1998) Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 7819-7824.
- Zanetti, A., Beauvais, F., Huet, J-C., and Pernollet, J-C.** (1992). Movement of elicitors, necrosis-inducing proteins secreted by *Phytophthora sp.*, in tobacco. *Planta*, **187**, 163-170.
- Zhao, J., and Last, R.L.** (1996). Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **8**, 2235-2244.
- Zhou, N., Tootle, T.N., Tsui, F., Klessig, D.F., and Glazebrook, J.** (1998). *PAD4* functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1021-1030.
- Zhou, N., Tootle, T.L., and Glazebrook, J.** (1999). *Arabidopsis* *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell*, **11**, 2419-1428.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux J-P., and Mauch-Mani B.** (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 12920-12925.

REMERCIEMENTS

A la fin de cette thèse, j'aimerais exprimer mes remerciements au Professeur Felix Mauch pour avoir été mon directeur de thèse. L'enseignement acquis sous sa supervision m'a été très instructif et me sera certainement bénéfique durant mon cheminement futur. Je remercie par ailleurs le Professeur Jean-Pierre Métraux, directeur de l'Institut de Biologie Végétale, pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans son institut ainsi que pour son précieux soutien, particulièrement lors de la dernière partie de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent également

- à mes collègues de labo et de bureau, à savoir Ulrich Wagner, Azzedine Si-Ammour et Pierre-Henri Dubuis. Je les remercie pour tous les bons moments passés en leur compagnie et pour tout ce que j'ai pu apprendre en les côtoyant quotidiennement. Merci aussi à Azzedine pour avoir effectué les hybridations des northern présentés dans le chapitre 3.

- à Gabor Jakab pour avoir eu la patience de m'enseigner les techniques de biologie moléculaire, pour m'avoir grandement aidé lors du clonage de l'élicite ainsi que pour avoir effectué les hybridations du Southern et des northern présentés dans le chapitre 4.

- aux laborantines de l'Institut, à savoir Ghislaine Rigoli, Linda Grainger, Laurence Charrier ainsi que Béatriz Kull car sans tous leurs coups de mains durant mon travail de diplôme puis lors de ma thèse, ma vie dans le labo aurait été bien plus compliquée.

- à Liliane Sticher, Michel Schneider, Christiane Nawrath, Laurence Moire, Peter Wick, Vipaporn Phunthumart, Emmanuel Boutet, Laurent Zimmerli ainsi que Damien Lieberherr, que j'ai côtoyés avec plaisir durant ces quatre dernières années et avec lesquels j'ai pu avoir des discussions fort intéressantes, sans parler des précieux coups de mains qu'ils m'ont donné.

- à Tony Buchala pour sa grande disponibilité, pour son aide lors des analyses d'acide salicylique et lors des mesures d'éthylène ainsi que pour avoir effectué les extractions et les mesures d'acide jasmonique.

- à Patrick Fraering de l'Institut de Biochimie de Fribourg pour sa collaboration lors d'expériences effectuées, mais non présentées, dans le cadre du chapitre 4.

- au Professeur Ulrich Gisi pour avoir accepté d'être mon expert externe.

Le dernier de mes remerciements s'en va à l'encontre de ma maman, pour sa présence et son indéfectible soutien tout au long de ces années.

CURRICULUM VITAE

Nom: Alexandra Roetschi

Naissance: 28 mai 1973, à Fribourg (FR)

Etat civil: célibataire

Origine: Soleure, Oensingen et Bolken (SO)

Formation:

1979-1988: Ecoles primaire et secondaire à Avenches (VD)

1988-1991: CESSNOV, Gymnase d'Yverdon (VD).
Baccalauréat, type D

1991-1993: Etudes de médecine vétérinaire à l'Université de Berne

1993-1997: Etudes de biologie à l'Université de Fribourg.
Diplôme de Biologie

1998-2001: Assistante à l'Institut de Biologie Végétale de l'Université de Fribourg.
Elaboration de la présente thèse sous la direction du Prof. Felix Mauch