

Université de Montréal

Répression du gène de défense *PR-10a* par SEBF
chez la pomme de terre

par
Brian Boyle

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en biochimie

Décembre, 2001

©, Brian Boyle, 2001



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Répression du gène de défense *PR-10a* par SEBF
chez la pomme de terre

présentée par :
Brian Boyle


a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Léa Brakier-Gingras
président-rapporteur

Normand Brisson
directeur de recherche

Muriel Aubry
membre du jury

Armand Séguin
examineur externe


représentant du doyen de la FES

Résumé (français)

Les plantes sont essentielles à la vie parce qu'elles procurent de l'oxygène et sont à la base de la chaîne alimentaire. Elles procurent aussi du bois pour la construction, des fibres pour les vêtements et de nombreux médicaments. Les maladies des plantes causent des dommages importants en agriculture et l'utilisation massive de pesticides n'obtient pas la faveur populaire. Il est donc impératif d'étudier la réponse de défense des plantes pour trouver une solution génétique durable au problème de destruction de récoltes par les pathogènes. Les gènes reliés à la pathogénie induits lors de l'attaque par un pathogène procurent d'excellents modèles pour l'étude de la régulation de la transcription lors de la réponse de défense. Le gène *PR-10a* de pomme de terre est induit en réponse à l'infection par un pathogène ou suite à un traitement avec un éliciteur. La caractérisation du promoteur de *PR-10a* a révélé la présence d'un élément de régulation négative (SE) entre les nucléotides -52 et -27 qui contribue de manière importante à la régulation de la transcription de *PR-10a*. Les travaux présentés dans cette thèse montrent l'isolement d'un facteur nucléaire (SEBF) qui peut lier de manière séquence spécifique le brin codant du SE. Le site consensus pour la liaison de SEBF est PyTGTCNC. Ce site est présent dans le promoteur de plusieurs gènes de défense et est similaire à l'élément de réponse aux auxines (AuxRE). L'analyse par mutagenèse du promoteur de *PR-10a* montre que l'expression de *PR-10a* est inversement corrélée à la liaison de SEBF in vitro. SEBF a été purifié à partir de tubercules de pommes de terre et l'analyse de son extrémité amino-terminale a permis l'isolement d'un clone d'ADNc. L'analyse de la séquence de cet ADNc a révélé que SEBF est homologue à des protéines chloroplastiques liant l'ARN qui possèdent des domaines de liaison à l'ARN à séquence consensus (cs-RBD) similaires à ceux retrouvés dans les hnRNP de mammifères. SEBF est présent dans les chloroplastes et le noyau, ce qui suggère des fonctions dans ces deux compartiments cellulaires. La surexpression de SEBF dans des protoplastes

réprime la transcription de *PR-10a*, confirmant ainsi la fonction de répresseur de la transcription de SEBF. Différentes hypothèses sur la participation de SEBF dans le contrôle de l'expression de *PR-10a* sont discutées et un modèle illustrant nos hypothèses sur la fonction de SEBF dans la réponse de défense est présenté.

Mots clés : Réponse de défense, régulation de la transcription, ADN simple brin, motifs de liaison à l'ARN, gènes *PR*

Résumé (anglais)

Plants are essential to life as they provide food and oxygen to all living organisms. They also provide shelter, clothing and medicine to human beings. Plant diseases often cause huge damage to crops and the development of new pesticides combined with breeding strategies did not reduce the percentage of crop loss for the past 30 years. It is therefore important to study how plants defend themselves against pathogens to find a long lasting genetic solution to crop destruction by pathogens. The well-characterized pathogenesis-related genes induced by pathogen invasion provide excellent models to study the transcriptional regulation of defense genes. The potato pathogenesis-related gene *PR-10a* is transcriptionally activated in response to pathogen infection or elicitor treatment. Characterization of the *cis*-acting elements of the *PR-10a* promoter revealed the presence of a silencing element (SE) between nucleotides -52 and -27 that contributes to transcriptional regulation. In this thesis, we have isolated a silencing element binding factor (SEBF) from potato tuber nuclei that binds to the coding strand (CS) of the SE in a sequence specific manner. The consensus binding site of SEBF, PyTGTCNC, is present in a number of *PR* genes and shows striking similarity to the auxin response element (AuxRE). Mutational analysis of the *PR-10a* promoter revealed an inverse correlation between the *in vitro* binding of SEBF and expression of *PR-10a*. SEBF was purified to homogeneity from potato tubers and sequencing of the N-terminus of the protein led to the isolation of a cDNA clone. Sequence analysis revealed that SEBF is homologous to chloroplast RNA binding proteins that possess consensus sequence type RNA binding domains (cs-RBD) characteristic of hnRNPs. SEBF was found in both chloroplasts and nuclei, suggesting functions in both subcellular compartments. Overexpression of SEBF in protoplasts repressed the activity of a *PR-10a* reporter construct in an SE-dependent manner, confirming the role of SEBF as a transcriptional repressor.

Our current knowledge of factors participating in *PR-10a* regulation is discussed and a model illustrating our views on the role of SEBF in plant defense responses is provided.

Keywords : Defense response, transcriptional regulation, single-stranded DNA, RNA binding domain, pathogenesis-related gene

Table des matières

RÉSUMÉ (FRANÇAIS)	III
RÉSUMÉ (ANGLAIS).....	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
DÉDICACE	XIII
REMERCIEMENTS	XIV
1. REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1.1 LES MALADIES DES PLANTES	1
1.1.1 <i>Importance des plantes</i>	1
1.1.2 <i>Maladies des plantes</i>	2
1.2 LE MILDIOU DE LA POMME DE TERRE.....	3
1.2.1 <i>La plante</i>	3
1.2.2 <i>Le pathogène</i>	4
1.3 MÉCANISMES DE DÉFENSE	5
1.3.1 <i>Barrières physiques et biochimiques préformées</i>	6
1.3.2 <i>Réponse hypersensible</i>	7
1.3.2.1 <i>Protéines PR</i>	8
1.3.2.2 <i>PR-10</i>	9
1.3.2.3 <i>Régulation</i>	10
<i>Les gènes de résistance</i>	11
<i>Les événements déclencheurs</i>	12
<i>Transduction du signal</i>	14
<i>Événements transcriptionnels</i>	15
<i>Le métabolisme secondaire et les hormones de défense</i>	18
<i>La mort cellulaire programmée</i>	19
1.3.3 <i>Réponse systémique acquise</i>	20
1.3.4 <i>Modèle de régulation de la réponse de défense</i>	21
1.4 CONTRÔLE TRANSCRIPTIONNEL DE L'EXPRESSION GÉNIQUE	22

1.4.1 L'ARN pol II.....	23
1.4.2 La topologie de l'ADN.....	24
1.4.3 Les facteurs de transcription.....	25
1.4.4 La répression	26
1.5 BUT ET PROBLÉMATIQUE DE CETTE THÈSE	27
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	30
2.1 Matériel.....	30
2.2 Construction avec gène rapporteur et essais β -glucuronidase.....	30
2.3 Préparation des extraits.....	31
2.4 Détermination des activités enzymatiques dans les extraits	32
2.5 Retardement sur gel.....	32
2.6 Purification de SEBF à partir d'extraits nucléaires.....	33
2.7 Clonage de SEBF.....	34
2.8 Analyse génomique de SEBF.....	35
2.9 Production d'anticorps et immunobuvardage	35
3. RÉSULTATS	36
3.1 LES PROTÉINES MAJEURES DU LATEX SONT DES PR-10	36
3.2 LA PROTÉINE SEBF RÉPRIME LA TRANSCRIPTION DE PR-10A.....	40
<i>Identification de SEBF.....</i>	40
<i>Il existe une corrélation entre la liaison de SEBF au SE et la répression du gène PR-10a.</i>	43
<i>La séquence PyTGTCNC définit le site de liaison de SEBF.....</i>	46
<i>La quantité de SEBF qui peut lier le SE varie peu dans des conditions où PR-10a est induit.....</i>	50
<i>Purification de SEBF.....</i>	50
<i>Clonage de SEBF.....</i>	53
<i>Distribution cellulaire de SEBF.....</i>	61
<i>Un seul gène code pour SEBF.....</i>	64
<i>SEBF peut réprimer la transcription.....</i>	64
4 DISCUSSION	70
<i>PR-10 dans le latex.....</i>	70
<i>Les protéines lient l'ADN simple brin et la régulation de l'expression génique par les hnRNP.....</i>	71
<i>Localisation cellulaire de SEBF.....</i>	74

<i>Le site de liaison de SEBF est présent dans d'autres gènes de défense et est similaire à l'élément de réponse aux auxines (AuxRE).</i>	76
<i>Régulation de PR-10a par SEBF.</i>	77
<i>Hypothèses et modèle de travail.</i>	79
<i>Conclusions et perspectives</i>	82
5 RÉFÉRENCES	85

Liste des tableaux

<i>Tableau I. Classification des protéines PR d'après Van Loon et al., 1994.....</i>	<i>8</i>
<i>Tableau II. Illustration de l'interaction gène pour gène.....</i>	<i>11</i>
<i>Tableau III. Le site de liaison de SEBF est présent dans des gènes de défense.....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau IV. Purification de SEBF à partir de noyaux de tubercules de pomme de terre.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau V. Prédiction TargetP de la localisation cellulaire de SEBF.....</i>	<i>59</i>

Liste des figures

<i>Figure 1. La signalisation cellulaire lors de la réponse de défense.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 2. Assemblage de l'ARN polymérase II au promoteur.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 3. Modèles de répression.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 4. Alignement de 12 PR-10 avec 6 protéines majeures du latex</i>	<i>37-38</i>
<i>Figure 5. SEBF lie l'ADN simple brin.....</i>	<i>41-42</i>
<i>Figure 6. Analyse par mutagenèse du SE.....</i>	<i>44-45</i>
<i>Figure 7. Détermination du site de liaison de SEBF.....</i>	<i>47-48</i>
<i>Figure 8. Étude de la liaison de SEBF dans des conditions qui induisent PR-10a.....</i>	<i>51-52</i>
<i>Figure 9. Purification de SEBF.....</i>	<i>55-56</i>
<i>Figure 10. Séquence de SEBF et alignement avec une famille de protéines chloroplastiques liant l'ARN qui sont codées par le noyau</i>	<i>57-58</i>
<i>Figure 11. Localisation cellulaire de SEBF</i>	<i>62-63</i>
<i>Figure 12. Organisation génomique de SEBF</i>	<i>65-66</i>
<i>Figure 13. La surexpression de SEBF réprime la transcription</i>	<i>68-69</i>
<i>Figure 14. Le latex qui suinte du pavot est une source de PR-10</i>	<i>71</i>
<i>Figure 15. Modèle de travail</i>	<i>80-81</i>

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CPM	Comptes par minute
EDTA	Ethylenedinitrilo tetraacetic acid
ERE	Elicitor response element
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
hnRNP	«heterogeneous nuclear ribonucleoprotein»
JA	Acide jasmonique
MLP	Protéines majeures du latex («major latex proteins»)
PR	Pathogenesis-related
ROS	Reactive oxygen species (superoxydes)
SA	Acide salicylique
SAR	Réponse systémique acquise («Systemic acquired resistance»)
SE	Silencing element
SEBF	Silencing element binding factor
TBP	TATA binding protein
U.V.	Ultraviolet

Dédicace

A ma famille, présente et passée

Remerciements

J'aimerais remercier Normand Brisson pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et les membres du jury pour avoir pris le temps d'évaluer cette thèse. J'aimerais aussi remercier Vicky Roy et Annie Dulude pour la poursuite du projet SEBF. Merci à Franz Lang, Gertraud Burger et leurs équipes pour le séquençage. Merci à Louise Cournoyer pour l'aide avec les transgéniques SEBF et les cellules de mammifères. Merci à Myreille Fyfe pour l'aide avec les lapins lors de la production des anticorps anti-SEBF. Merci à mes stagiaires Magali et J.F. pour leur aide. Merci à Gopal pour son aide avec les essais de phosphorylation. Merci aux membres du labo Brisson pour les discussions fructueuses et leur aide. Merci à tout les autres que je n'aurais pas du oublier.....

1. Revue de la littérature

1.1 Les maladies des plantes

1.1.1 Importance des plantes

Les plantes sont essentielles à l'équilibre naturel. Elles produisent de l'oxygène et des sucres en utilisant de l'eau, du CO₂ et l'énergie du soleil par la photosynthèse. Par ce mécanisme, les plantes jouent un rôle important dans le maintien de la balance en CO₂ de la planète pour contrer l'effet de serre. Elles sont à la base de la chaîne alimentaire en servant de nourriture aux herbivores et omnivores qui consomment fruits, graines et légumes. Les plantes sont d'autant plus importantes pour l'être humain qui s'en sert non seulement comme nourriture mais aussi dans diverses activités. Il y a toute l'industrie du bois qui sert à la construction, à la fabrication de meubles et autres objets de tous les jours. Les plantes comme le coton, le lin et le chanvre sont utiles dans la confection de vêtements. Le charbon et le pétrole sont des combustibles d'origine végétale. Il faut aussi mentionner les plantes médicinales desquelles sont dérivés plusieurs médicaments dont l'aspirine et la morphine. Finalement, les plantes servent à la décoration pour leurs aspects esthétiques, leurs couleurs et leurs structures.

Au cours des quarante dernières années, la population mondiale a augmenté de 90 %, alors que la production agricole mondiale n'augmentait que de 25 %. De plus, au cours des deux dernières années, la production mondiale de céréales (incluant le riz) s'est avérée inférieure à la demande (FAO, 2001). Pour le moment, cette situation n'est pas dramatique puisque d'importantes réserves avaient été amassées au cours des années. Cependant, on prévoit que la population mondiale s'accroîtra de plus de 1 milliard d'individus d'ici

2025, provoquant d'importantes pénuries et l'augmentation des famines, non seulement dans les pays en voie de développement, comme c'est le cas actuellement, mais aussi dans les pays industrialisés (Dyson, 1999).

L'agriculture fait donc maintenant face à deux défis importants : augmenter sa productivité et diminuer ses pertes .

1.1.2 Maladies des plantes

Les maladies des plantes ont une importance pour l'être humain car elles affectent les plantes et tous les produits qui en sont dérivés. La majorité de la population mondiale dépend encore des produits agricoles qu'elle cultive localement et la qualité des récoltes influe grandement sur la qualité de vie dans les pays en voie de développement. Les maladies des plantes peuvent être causées par des bactéries, mycètes, nématodes, virus et insectes, mais jusqu'à maintenant les dommages causés aux plantes par l'humain et les gros animaux herbivores ne sont pas considérés comme des maladies. Les maladies des végétaux ont souvent un effet important sur les variétés de plantes qui peuvent être cultivées dans une région géographique car elles peuvent détruire complètement les plantes particulièrement sensibles à la maladie. Par exemple, le mildiou de la pomme de terre a complètement détruit les pommes de terre en Irlande et causé la mort d'un million de personnes en 1845-46. De plus, certaines maladies sont présentes à l'échelle mondiale et sont à l'origine de pertes importantes d'un point de vue économique. La rouille des céréales, la jaunisse des betteraves, la maladie de Sigatoka qui affecte les bananes, le mildiou de la pomme de terre et bien d'autres causent des milliards de dollars de pertes annuellement. De plus, même avec l'obtention de variétés plus résistantes par croisement et le développement de meilleurs pesticides, les pertes de récoltes dues aux pathogènes se situent entre 10 et 30 pour cent et parfois plus des productions mondiales annuelles, tout dépendant de la plante et de la région géographique (Oerke et Dehne, 1997). Il semble que, dans l'avenir,

les techniques traditionnelles de transfert de gènes et l'utilisation de produits chimiques (pesticides) ne seront pas suffisantes pour limiter les pertes dues aux pathogènes. Il devient donc de plus en plus important d'étudier les mécanismes de défense des plantes afin de développer de nouvelles approches, biotechnologiques ou autres, pouvant mener à une meilleure protection des cultures.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la réponse de défense, nous étudions comment la pomme de terre se défend contre l'oomycète *Phytophthora infestans*, l'agent causal du mildiou de la pomme de terre. Nous nous intéressons plus particulièrement aux mécanismes d'induction des gènes de défense. Notre approche consiste à caractériser une extrémité de la réponse de défense et remonter le courant vers les événements déclencheurs de celle-ci. Pour ce faire, le laboratoire a développé le système modèle du gène *PR-10a* qui est induit suite à l'infection. Divers éléments de régulation, tant positifs que négatifs, ont été identifiés et font présentement l'objet d'études plus approfondies. Le but de mon projet est de caractériser un élément de régulation négatif de l'expression de *PR-10a* et des facteurs qui peuvent s'y lier. Il est connu que les facteurs de transcription qui participent à la régulation d'un phénomène agissent sur plusieurs cibles et l'altération de leur activité par transgénèse offre des perspectives intéressantes pour l'amélioration des cultures.

1.2 Le mildiou de la pomme de terre

1.2.1 La plante

Les pommes de terre sont consommées dans les Andes depuis plus de 8000 ans. Au 16^e siècle, les conquistadores espagnols ont ramené cette plante en Europe. Au 19^e siècle, sa culture était dispersée à travers le continent et procurait une source de nourriture abondante et peu coûteuse. Aujourd'hui, la

pomme de terre est la quatrième plus grande production agricole végétale au monde avec près de 300 millions de tonnes métriques (IPC, 2001). La production de pomme de terre croît à un taux de 4,5% par année depuis 1990 et sa consommation dans les pays industrialisés est passé de 9 à 14 kg par personne par année (IPC, 2001). Au Canada, les pommes de terre sont le produit de culture végétale qui génère le plus de revenus avec plus de 608 millions de dollars en 1998 (Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 1998/99). Pour en savoir plus, le lecteur est invité à visiter les sites WEB du centre international de la pomme de terre (<http://www.cipotato.org/>) et d'agriculture Canada (<http://www.agr.ca/>).

1.2.2 Le pathogène

P. infestans a été décrit pour la première fois par un ancien chirurgien de l'armée de Napoléon, le Dr Montagne qui, suite à des observations au microscope, nota une ressemblance entre ce micro-organisme et ceux du genre *Botrytis* et le nomma *Botrytis infestans* Mont. Une analyse plus approfondie effectuée par Anton de Bary écarta ce micro-organisme du genre *Botrytis*. De Bary créa donc le genre *Phytophthora* qui vient des mots grecs *phyto* et *phthora* qui veulent dire plante et destructeur respectivement. Il conserva la dénomination *infestans* en l'honneur de Montagne et renomma le pathogène *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *P. infestans*, un oomycète, se distingue des autres mycètes par la présence de spores mobiles appelées zoospores (Agrios, 1988).

P. infestans est un biotrophe obligatoire, c'est-à-dire qu'il se nourrit de matière vivante pour survivre et se multiplier. *P. infestans* se reproduit de manière asexuée en formant des sporanges au bout de sporangiophores (Maxwell et Maxwell, 2001). Les sporanges sont dispersés par le vent et la pluie vers d'autres plants. Si les conditions sont favorables (température entre 12 et 15°C), le noyau du sporange va se diviser et le cytoplasme se séparer pour

généraler de 3 à 8 zoospores biflagellées et mobiles. Les zoospores perdent éventuellement leurs flagelles pour former un kyste jusqu'au moment où elles se retrouvent sur une feuille pour germer. Durant les périodes de pluie intense, les sporanges, zoospores et kystes sont lavés des feuilles et tombent sur le sol où ils peuvent alors infecter les tubercules qui se développent près de la surface.

Lors de la germination, *P. infestans* produit un appressorium qui pénètre la cuticule et les couches épidermiques du tissu végétal sans produire d'enzymes pour la macération des tissus. Dès l'entrée dans la cellule végétale, il y a formation d'une structure, appelée haustoria, pour soutirer les substances nutritives de la cellule infectée. Les hyphes produits continuent de se propager à l'intérieur de la feuille pour sortir par le bas via les stomates. *P. infestans* ne peut tolérer les basses températures de l'hiver, même dans les débris de tissus végétaux aériens. Cependant, lors de l'infection d'un tubercule, *P. infestans* peut survivre à l'hiver sous forme de mycélium et former des sporanges au printemps suivant.

P. infestans peut aussi se reproduire de manière sexuée en formant des gamètes sur des hyphes différents. Ce pathogène est donc hétérothallique et il a besoin d'un partenaire de type différent pour se reproduire de manière sexuée. Il existe deux types connus de *P. infestans* (A1 et A2) dont un est à peine présent en Amérique du Nord. L'union des gamètes sexués engendre la formation d'une oospore avec une paroi cellulaire très épaisse qui lui permet de résister à l'hiver. Ce type de reproduction permet un échange d'information génétique qui lui permet d'évoluer vers des individus de plus en plus infectieux.

1.3 Mécanismes de défense

Les plantes ne peuvent se mouvoir et sont la proie de pathogènes qui sont pour leur part mobiles ou possèdent des modes de dispersions efficaces. Les plantes ont toutefois réussi à développer des mécanismes de défense efficaces

qui leur permettent de faire face aux micro-organismes. Pour causer la maladie, un pathogène doit d'abord traverser des barrières physiques et biochimiques non-spécifiques mises en place par les plantes (Agrios, 1988). Par la suite, il doit éviter d'être reconnu par la plante et ainsi déclencher la réponse dite hypersensible (Dixon et al., 1994). Cette dernière amène à son tour une résistance systémique de la plante qui prévient l'infection des tissus distants et non-infectés (Ryals et al., 1996). Finalement, les plantes peuvent probablement communiquer entre elles et ainsi avertir qu'une attaque par un pathogène est en cours. En effet, les tissus infectés ou en proie aux herbivores émettent différentes hormones volatiles tels l'éthylène, le méthyl-jasmonate et le méthyl-salicylate qui peuvent induire les gènes de défense intra- ou même inter-espèces (Farmer et al., 2001). Les mécanismes de défense mis en place par les plantes sont à ce point efficaces que la maladie est l'exception plutôt que la règle.

1.3.1 Barrières physiques et biochimiques préformées

La surface de la plante est la première ligne de défense que doit traverser un pathogène (Agrios, 1988). Une couche de cire appelée cuticule couvre les feuilles et constitue une barrière physique. La cire prévient également la formation de gouttelettes d'eau essentielles pour la germination (mycètes) ou la multiplication (bactéries) des pathogènes. Le pathogène doit par la suite traverser la paroi cellulosique des cellules épidermiques. Ces cellules ont souvent une paroi cellulaire très épaisse qui rend la pénétration des pathogènes difficile. L'infection de ces plantes n'est souvent possible qu'après une blessure qui expose les tissus internes plus fragiles. Les stomates, qui permettent les échanges gazeux entre la plante et son environnement, constituent une brèche dans les barrières physiques de la plante et demeurent la seule porte d'entrée pour certains pathogènes.

Des barrières biochimiques sont aussi dressées devant les pathogènes. Lors de l'infection, certains micro-organismes ne retrouvent pas tous les nutriments ou facteurs de croissance dont ils ont besoin pour croître dans la plante infectée, ce qui arrête leur progression. D'autre part, les plantes produisent des tannins et autres composés phénoliques qui inhibent la croissance de certains pathogènes. De plus, certains composés peptidiques préformés ont aussi des propriétés antimicrobiennes (Broekaert et al., 1995).

1.3.2 Réponse hypersensible

Lorsque le pathogène réussit à traverser les défenses non-spécifiques, il rencontre les défenses spécifiques mises en place par les végétaux. La réponse hypersensible est définie comme la mort rapide et localisée de cellules végétales en réponse à l'infection par un micro-organisme avirulent. Cette mort cellulaire est facilement observable par l'apparition de lésions nécrotiques au site d'infection. La réponse hypersensible est à la base d'une résistance locale et systémique de la plante infectée.

La plante infectée doit rapidement bloquer la progression du pathogène vers les tissus adjacents. Un changement rapide du métabolisme qui oriente les ressources de la cellule vers la réponse de défense provoque le renforcement de la paroi cellulaire des cellules environnantes et la synthèse de composés antimicrobiens (Somssich et Hahlbrock, 1998; von Röpenack et al., 1998; Dixon, 2001). Par la suite, la perception du pathogène induit plusieurs gènes liés à la pathogénie et les produits de ces gènes sont appelés protéines PR («pathogenesis-related»).

1.3.2.1 Protéines PR

Les protéines PR ont été décrites pour la première fois en 1970 (van Loon et van Kammen, 1970). Ce n'est que plus tard qu' Antoniwi et ses collaborateurs (1980) les définiront comme des protéines de la plante hôte induites lors de la pathogénie ou autres situations reliées comme l'attaque par un herbivore, insecte ou nématode. L'accumulation des protéines PR représente le changement majeur dans la composition protéique à se produire lors de la réponse hypersensible. Elles sont présentes chez toutes les plantes et sont divisées en 11 catégories (Tableau I; Van Loon et al., 1994).

Tableau I. Classification des protéines PR d'après Van Loon et al., 1994

Protéine PR	Fonctions ou propriétés	Autres noms
PR-1	Antifongique	PR-1 basique
PR-2	1,3- β -glucanase	Glucanase basique
PR-3	Endochitinase	Chitinase basique
PR-4	Endochitinase	win («wound induced»)
PR-5	Antifongique	Osmotin, «thaumatin-like»
PR-6	Inhibiteur de protéase	Inhibiteur de subtilysin
PR-7	Endoprotéase	P69, P70
PR-8	Endochitinase, lysozyme	Chitinase acide
PR-9	Peroxydase	P39a, P40a
PR-10	Activité ribonucléase?	PR intracellulaire
PR-11	Endochitinase	Chitinase de classe V

La plupart des protéines PR ont une activité enzymatique qui peut nuire à la propagation du pathogène. Les protéines PR-1 et PR-5 ont une affinité pour

la membrane cellulaire, des pathogènes ce qui leur confère une activité antifongique (Niderman et al., 1995; Abad et al., 1996). Les chitinases (PR-3, -4, -8, -11) et les glucanases (PR-2) sont des enzymes qui ont pour substrat la chitine et les 1,3- β -glucans respectivement. Ces polymères sont les composantes majeures de la paroi cellulaire de plusieurs mycètes. Certaines chitinases peuvent aussi avoir une activité lysozyme (PR-8) capable de dégrader les peptidoglycans de la paroi bactérienne. Les chitinases et glucanases inhibent la croissance de pathogènes lorsqu'elles sont exprimées seules ou ensembles (Mauch et al., 1988). Les inhibiteurs de protéases (PR-6) peuvent inhiber de manière non-réversible des protéases microbiennes (Geoffroy, et al., 1990) et peuvent aussi être efficaces contre les insectes herbivores (Ryan, 1990). Les peroxydases (PR-9) seraient pour leur part impliquées dans la production de peroxydes qui renforcent la paroi cellulaire en réagissant avec les protéines riches en prolines de la paroi cellulaire (Bradley et al., 1992). Le rôle exact des deux familles restantes (PR-7, -10) reste nébuleux puisque aucune cible pour leur action n'a été identifiée jusqu'à maintenant.

1.3.2.2 PR-10

Les PR-10 sont des protéines intracellulaires, acides, d'environ 17 kD qui s'accumulent lors de la réponse hypersensible. On pense qu'elles se retrouvent chez toutes les espèces de plantes puisqu'elles ont été isolées d'une très grande variété de plantes (Somssich et al., 1986, Fritensky et al., 1988, Matton et Brisson, 1989; Warner et al., 1992). La classification ribonucléase des PR-10 (tableau I) vient de la purification de ribonucléases du ginseng possédant de l'homologie avec les PR-10 (Moiseyev, et al., 1994). Depuis, plusieurs groupes ont rapporté des activités similaires (Swoboda et al., 1996; Moiyesev et al., 1997; Bantignies et al., 2000). Cependant, les PR-10 ne possèdent aucune similarité de séquence ou de structure avec d'autres ribonucléases (Gajhede et al., 1996). Outre la pathogénie, les PR-10 sont induites par de nombreux stress

comme la présence de métaux lourds (Utriainen et al., 1998), la sécheresse (Dubos et Plombion, 2001), la blessure (Warner et al., 1992), le froid (Yu et al., 2000), l'ozone (Paakkonen et al., 1998), la salinité (Moons et al., 1997), la noirceur (Walter et al., 1996) et les U.V.(Pinto et Ricardo, 1995).

Les *PR-10* ont aussi un patron d'expression régulé par le développement et sont exprimées dans certains tissus floraux. Le gène *PR-10a* de la pomme de terre est exprimé de façon constitutive dans le stigmate (Constabel et Brisson, 1995). Tandis que chez le bouleau, les *PR-10* sont exprimées de manière constitutive dans le pollen et sont responsables de 95% des allergies au pollen de bouleau (Jarolim et al., 1989). Chez le pin, le niveau des *PR-10* varie avec les saisons (Ekramoddoullah et al., 2000). Chez la fève et la pomme, les *PR-10* sont synthétisées dans les tissus vieillissants (Walter et al., 1996; Puhriinger et al., 2000). De plus, les *PR-10* semblent être sous le contrôle de plusieurs hormones végétales (Moons et al., 1997 ; Wang et al., 1999 ; Poupard et al., 2001) et répondent à l'acide salicylique (Pinto et Ricardo, 1995 ; Thulke et Conrath, 1998 ; Puhriinger et al., 2000)

1.3.2.3 Régulation

L'utilisation du terme avirulent dans la définition de la réponse hypersensible est importante. Ce terme implique par définition la résistance de la plante hôte et donc la reconnaissance génétique du pathogène. Une question surgit, comment se fait la reconnaissance du pathogène ? Le pathogène possède dans son génome l'information codant pour des facteurs d'avirulence (*avr*). Ces derniers sont reconnus chez la plante par le produit des gènes de résistance (*R*). Voilà les bases de la théorie de l'interaction gène pour gène qui stipule que le produit d'un gène d'avirulence (*avr*) chez le pathogène est reconnu par le produit d'un gène de résistance (*R*) chez la plante. Cette résistance est allélique et peut être séparée génétiquement de façon mendélienne. On peut donc retrouver des variétés d'une même espèce de

plante qui sont résistantes à certaines races d'un même pathogène et susceptibles à d'autres. Ceci est illustré au tableau II où la plante de variété A, qui possède le gène de résistance R1, est résistante à la race 1 du pathogène qui possède le gène d'avirulence avr1. Elle est cependant susceptible à la race 2 qui ne possède pas ce gène. De même, la variété B est résistante à la race 2 et susceptible à la race 1. Certaines variétés possèdent les deux gènes de résistance R1 et R2 (variété D) et peuvent donc résister aux races 1 et 2. Cependant, un désastre peut survenir lorsqu'un pathogène de race 3 atteint une région géographique contenant des plantes des variétés A, B, C ou D à cause de l'absence de résistance génétique au gène d'avirulence 4. Le gène de résistance n'est pas présent dans les variétés locales et ne peut donc être transféré par croisement rendant la croissance de cette plante presque impossible dans cette région.

Tableau II. Illustration de l'interaction gène pour gène

Plante	Pathogène		
	race 1 (avr1)	race 2 (avr2)	race 3 (avr4)
variété A (R1)	Résistance	Maladie	Maladie
variété B (R2)	Maladie	Résistance	Maladie
variété C (R3)	Maladie	Maladie	Maladie
variété D (R1, R2)	Résistance	Résistance	Maladie

Les gènes de résistance

Des études récentes ont permis l'isolement des premiers gènes de résistance (Martin et al., 1993 ; Bent et al., 1994 ; Jones et al., 1994 ; Whitham et al., 1994). Depuis, plusieurs autres gènes de résistance ont été isolés et l'on peut maintenant les regrouper en cinq familles (Dangl et Jones, 2001). La

première famille de protéines de résistance se retrouve dans le cytoplasme probablement associée à la membrane et se divise en deux sous familles. Ce sont les NB-LRR qui sont caractérisés par la présence d'un site de liaison à un nucléotide (NB) et d'une extrémité carboxy-terminale riche en leucine (LRR). Le LRR est un domaine d'interaction avec des protéines ou des hydrates de carbone (Kajava, 1998). Les deux sous-familles se distinguent par leurs extrémités amino-terminales. L'une possède un domaine «coiled-coil» (CC-NB-LRR) et l'autre un domaine similaire au récepteur Toll ou à celui de l'interleukine (TIR-NB-LRR). La deuxième famille, la famille Cf-X, se compose de protéines transmembranaires possédant un domaine LRR extracellulaire. La troisième famille se compose de protéines kinases intracellulaires du type Pto ou Fen. La famille de type Xa21 semble être un hybride entre la deuxième et la troisième famille puisqu'elle se compose de protéines transmembranaires possédant un LRR extracellulaire et un domaine kinase intracellulaire. Les protéines du type RPW8 constituent la dernière famille et sont des protéines probablement membranaires possédant un domaine d'interaction «coiled-coil». L'analyse du génome d'*Arabidopsis* révèle la présence d'environ 400 à 450 gènes ayant de la similarité aux gènes de résistance. Des évidences récentes démontrent que certaines protéines de résistance doivent agir en concert avec une autre protéine pour conférer la résistance aux pathogènes (Salmeron et al., 1994).

Les événements déclencheurs

Les molécules reconnues par la plante lors d'une infection sont appelées éliciteurs parce qu'elles induisent la réponse de défense. Les éliciteurs sont souvent le produit des gènes d'avirulence du pathogène mais peuvent aussi provenir de la dégradation de la plante par des enzymes bactériens ou fongiques (Bruce et West, 1982 ; Davis et al., 1984). La reconnaissance de ces molécules se fait de manière directe ou indirecte par le produit des gènes de résistance. S'ensuit une dépolarisation membranaire qui active des peroxydases

et NADPH oxydases pour générer des superoxydes (ROS, « reactive oxygen species ») (Bolwell et al., 1998 ; Martinez et al., 1998). A partir de ce moment, plusieurs routes sont induites qui mènent toutes à la manifestation de la réponse hypersensible.

Le H₂O₂ est une molécule importante dans l'initiation de la réponse de défense. La détection de peroxyde par les plantes amène une induction des gènes codant pour les protéines de détoxication, la glutathione-S-transférase (GST) et la glutathione peroxydase (Lamb et Dixon, 1997). Le H₂O₂ participe aussi au renforcement de la paroi cellulosique qui la rend plus résistante à la dégradation par des enzymes microbiens (Brisson et al., 1994). De plus, la production de peroxyde agit comme agent antifongique en bloquant la germination des spores de plusieurs champignons (Peng et Kuc, 1992).

Outre la production de superoxydes, la génération d'oxyde d'azote (NO) a été détectée lors d'une interaction incompatible (Delledonne et al., 1998 ; Durner et al., 1998). Le NO provoque une ouverture des canaux calciques qui résulte en une augmentation intracellulaire du calcium (Durner et al., 1998). L'augmentation du niveau intracellulaire de calcium est l'un des événements les plus précoces suivant la détection du pathogène (Xu et Heath, 1998). Cette augmentation de calcium contribue à l'activation des NADPH oxydases pour stimuler la production de peroxyde et renforcer la paroi cellulaire (Keller et al., 1998). De plus, le calcium est un cofacteur essentiel dans l'activation de kinases dépendantes du calcium (CDPK, « calcium dependent protein kinase») qui sont activées rapidement lors d'une interaction incompatible (Romeis et al., 2000). Finalement, des calmodulines sont induites lors d'une interaction incompatible et elles semblent participer à l'activation de la réponse de défense suite à l'augmentation intracellulaire de calcium (Heo et al., 1999).

Transduction du signal

Plusieurs protéines kinases sont impliquées dans la transmission du signal après la détection du pathogène. Les protéines R du genre Pto et Xa21 possèdent un domaine Ser/Thr kinase (Dangl et Jones, 2001). Des études de deux hybrides chez la levure ont permis l'isolement de substrats pour Pto. Le groupe de G. Martin a démontré qu'un interacteur de Pto, la protéine kinase Pti1, est impliquée dans la résistance de la tomate à l'infection par *P. syringae* (Zhou et al., 1995). Le même groupe a aussi démontré la phosphorylation par Pto de facteurs de transcription impliqués dans la réponse de défense (Gu et al., 2000).

Plusieurs cascades impliquant des MAP kinases (MAPK, «mitogen-activated protein kinase») sont mises à contribution dans la régulation de la réponse de défense. Les MAPKs de tabac, WIPK et SIPK, sont activées lors de l'infection ou du traitement avec un éliciteur (Zhang et Klessig, 1998 ; Romeis et al., 1999). Des homologues de WIPK et SIPK sont aussi induites en réponse à l'éliciteur chez le persil et la luzerne, tandis que seul l'homologue de SIPK (MPK6) est impliqué chez *Arabidopsis* (Nürnbergger et Scheel, 2001). Chez le persil, l'homologue de WIPK se déplace vers le noyau suite à l'infection probablement pour contrôler l'activité de facteurs de transcription (Ligterink et al., 1997). WIPK et SIPK sont activées par la MAPK kinase (MAPKK) MEK2 et ensemble vont induire certains gènes de défense ainsi que la mort cellulaire programmée (Yang et al., 2001). Chez *Arabidopsis* le peroxyde active la réponse de défense via la MAPKK Kinase (MAPKKK) ANP1 qui contribue à l'activation de MPK6 (SIPK) et MPK3 (WIPK) (Kovtun et al., 2000). MAPK4 régule de manière négative la réponse de défense d'*Arabidopsis* car son inactivation par un transposon résulte en un niveau élevé d'acide salicylique, une expression constitutive des gènes *PR* ainsi qu'une résistance accrue aux pathogènes virulents (Petersen et al., 2000). EDR1 (MAPKKK) est aussi impliquée dans le contrôle négatif de la réponse de défense mais tout indique que ce mécanisme est indépendant de MPK4 (Frye et al., 2001). Les cascades

de MAPK semblent jouer un rôle important dans la réponse de défense via un réseau complexe de signalisation où les intervenants ne sont pas encore tous identifiés.

Chez la pomme de terre, des évidences biochimiques démontrent l'implication d'un homologue de protéine kinase C (PKC) dans la résistance contre *P.infestans* (Subramaniam et al., 1997). Cette étude a aussi révélé l'implication de cette kinase dans l'augmentation de la liaison du facteur PBF-2 à l'élément de réponse à l'éliciteur du gène *PR-10a*. De même, une étude chez le soya rapporte que la phosphorylation de G/HBF-1 sur des sérines par une protéine kinase cytosolique augmente son affinité pour le promoteur du gène de défense *chs15* suite à l'infection par une race avirulente de pathogène (Dröge-Laser et al., 1997). Ces études suggèrent que la phosphorylation de facteurs de transcription est l'événement terminal d'une cascade de signalisation requise pour l'activation précoce des gènes de défense.

Événements transcriptionnels

L'aboutissement de la détection d'un pathogène est la transcription des gènes de défense. Le niveau d'expression des gènes de défense varie beaucoup d'un gène à l'autre et ces variations sont dues à l'arrangement du promoteur de chaque gène. Plusieurs éléments de régulation ainsi que plusieurs facteurs liant ces éléments ont été répertoriés.

Les boîtes GCC (AGCCGCC) sont présentes dans le promoteur de plusieurs gènes de défense et servent d'élément de réponse à l'éthylène (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995). La synthèse de l'éthylène augmente rapidement suite à l'infection, ce qui résulte en une activation des gènes de défense via les boîtes GCC (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995 ; Zhou et al., 1997). Cependant, d'autres gènes répondant à l'éthylène qui ne sont pas impliqués dans la réponse de défense, comme les gènes contrôlant le mûrissement des

fruits, ne possèdent pas de boîtes GCC et ne sont pas induits suite à l'infection ce qui semble indiquer que la perception de l'éthylène se fait par différents mécanismes (Deikman, 1997). Plusieurs protéines liant les boîtes GCC sont membres de la famille des EREBP («Ethylene response element binding protein»), qui sont caractérisées par un domaine de liaison à l'ADN très conservé d'une soixantaine d'acides aminés et unique aux plantes (Allen et al., 1998). La première démonstration de l'implication de ces protéines dans la réponse de défense est survenue lors de la recherche d'interacteurs pour la protéine de résistance Pto. En effet, la protéine de résistance Pto interagit avec Pti4, Pti5 et Pti6 qui sont des EREBP de tomate qui reconnaissent les boîtes GCC de manière spécifique (Zhou et al., 1997). Pti4 est phosphorylé par Pto et cela augmente sa capacité à lier les boîtes GCC. De plus, la coexpression de Pto et Pti4 dans des feuilles de tomate amène une augmentation de la transcription des gènes contenant des boîtes GCC dans leur promoteur (Gu et al., 2000). Ces observations suggèrent un lien direct entre une protéine de résistance et l'activation des gènes de défense contenant des boîtes GCC. De plus, la surexpression de l'EREBP Tsi1 dans le tabac induit la transcription de plusieurs gènes de défense résultant en une résistance accrue aux pathogènes (Park et al., 2001). Bien que la majorité des EREBP soient associés à l'activation des gènes de défense (Zhou et al., 1997; Fujimoto et al., 2000; Park et al., 2001), les EREBP de la classe II agissent comme répresseurs de la transcription (Fujimoto et al., 2000).

Les boîtes W (TTGACC ou TGAC-N_x-GTCA) sont présentes dans le promoteur de plusieurs gènes de défense et agissent comme éléments de réponse à l'éliciteur dans le contrôle des gènes *PR-10* de persil, *PR-1* de maïs et *CHN50* (chitinase) de tabac (Fukuda et Shinshi, 1994; Raventos et al., 1995; Rushton et al., 1996). Les boîtes W sont reconnues par les facteurs WRKY qui sont caractérisés par la présence d'une ou deux copies du domaine WRKY qui est conservé dans tous les membres de la famille (Rushton et al., 1996; Eulgem et al., 2000). Ce domaine, d'une soixantaine d'acides aminés, contient un nouveau type de motif à doigt de zinc (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X-H) à l'extrémité C-

terminale et la séquence WRKYGQK en N-terminale (Rushton et al., 1995; de Pater et al., 1996). Les WRKY ont été identifiés dans plusieurs espèces végétales et semblent eux aussi être uniques aux plantes. Le traitement à un éliciteur induit rapidement la transcription de WRKY1, -2, -3 précédant de peu l'expression du gène *PR-10* chez le persil, ce qui suggère un rôle dans la réponse de défense. (Rushton et al., 1996). De plus, ZAP1 et WRKY1 peuvent activer la transcription à partir de boîtes W dans la levure et dans les cellules de plantes (de Pater et al., 1996; Eulgem et al., 1999). Une étude récente démontre un rôle important pour les boîtes W et les WRKY dans la régulation de la réponse systémique acquise (SAR) par le contrôle de l'expression de *NPR1* (Yu et al., 2001). Finalement, l'étude effectuée par Eulgem et al. (1999) suggère que WRKY1 pourrait agir sur sa propre transcription pour une amplification rapide du signal menant à l'expression des gènes de défense.

Une autre classe d'éléments est représentée par les boîtes L et P du promoteur des gènes *PAL* et *4-CL* chez le persil et de la boîte H du promoteur de la chalcone synthase chez la fève. Ces éléments ont été caractérisés comme éléments de réponse au traitement à un éliciteur et contrôlent surtout l'expression des gènes du métabolisme secondaire (Lois et al., 1989; Logemann et al., 1995 ; Faktor et al., 1997). Ces éléments possèdent la séquence consensus pour la liaison des facteurs MYB de type II (A[A/C]C[A/T]A[A/C]C) et sont reconnus suite au traitement avec un éliciteur par des protéines MYB ce qui suggère leur participation dans la réponse de défense (da Costa et al., 1993; Feldbrügge et al., 1997).

Les boîtes G (CACGTG) répondent à plusieurs signaux de stress dont l'infection et lient des protéines bZIP (Menkens et al., 1995). Ils peuvent fonctionner de concert avec les boîtes H (MRE) pour l'induction de certains gènes. Les éléments de réponse aux pathogènes *ocs* (aussi appelé *as-1*) sont aussi reconnus par des protéines bZIP, appelées TGA, en réponse à l'infection (Lam et al., 1989; Lam et Lam, 1995). Les protéines bZIP semblent donc jouer un rôle important dans la réponse de défense. La phosphorylation rapide de

G/HBF-1 de soya suite au traitement avec un éliciteur augmente son affinité pour les boîtes G et H, ce qui suggère sa participation dans la réponse de défense (Dröge-Lasser et al., 1997). L'acide salicylique qui participe à l'induction locale ainsi qu'à l'induction de la réponse systémique acquise (SAR) induit certains gènes de défense via les éléments *ocs* (Chen et Singh, 1999). De plus, la protéine NPR1 d'Arabidopsis, qui est essentielle pour la réponse systémique acquise, favorise la liaison des facteurs TGA aux éléments *ocs* (Després et al., 2000). Finalement, OBF4, une protéine liant un élément *ocs*, interagit avec une protéine de la famille des EREBP, ce qui suggère une interaction complexe entre les facteurs de transcription qui contrôlent la réponse de défense (Büttner et Singh, 1997).

D'autres éléments moins connus de réponse aux pathogènes ont été identifiés. L'élément de réponse à l'éliciteur (ERE) du gène *PR-10a* de pomme de terre est fixé par les facteurs PBF (Després et al., 1995). La liaison d'un de ces facteurs *in vitro*, PBF-2, montre une bonne corrélation avec l'activité de l'élément *in vivo* (Desveaux et al., 2000). PBF-2 représente une nouvelle classe de facteurs de transcription liant l'ADN simple brin (Desveaux et al., 2000 ; Desveaux, Joyeux et Brisson non-publié). Finalement, plusieurs évidences indiquent que la protéine Ntlim1 contrôle l'expression des gènes du métabolisme secondaire via la boîte PAL riche en AC (Kawaoka et Ebinuma, 2001).

Le métabolisme secondaire et les hormones de défense

Un bouleversement biochimique se produit suite à l'infection par un pathogène et les ressources de la plante sont réorientées du métabolisme primaire vers le métabolisme secondaire. Les changements sont surtout observables au niveau de la voie métabolique des phénylpropanoïdes (Lamb et al., 1989; Somssich et Hahlbrock, 1998). Chez toutes les espèces de plantes, les enzymes phénylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamate 4-hydroxylase

(C4H) et 4-coumarate-CoA ligase (4CL) sont induites par des stress environnementaux incluant l'attaque par un pathogène (Dixon et Paiva, 1995). Suite à l'action de PAL, la phénylalanine est transformée en acide trans-cinnamique qui est un précurseur de l'acide salicylique, une hormone de défense impliquée dans l'induction de la réponse de défense locale et systémique. La transformation de l'acide trans-cinnamique par l'action subséquente de C4H et 4CL engendre du 4-hydroxycinnamoyl-CoA qui sert de précurseur à la synthèse de composés antimicrobiens appelés phytoalexines via l'action de la chalcone synthase et à la synthèse de la lignine via l'action de la 4-coumaroyl-CoA réductase. Dans plusieurs systèmes, l'accumulation de phytoalexines est l'aboutissement de la majeure partie des composés phénoliques tandis que l'augmentation de la synthèse de la lignine est importante pour le renforcement de la paroi cellulaire (Smith, 1996). Le métabolisme secondaire par l'action de lipases va générer de l'acide jasmonique et son dérivé volatile, le méthyl-jasmonate, en plus de générer de l'éthylène par l'action de l'ACC synthase (Dixon, 2001). Les hormones volatiles de défense tels l'éthylène, les jasmonates et les salicylates sont capables d'induire la transcription de plusieurs gènes de défense (Reymond et Farmer, 1998 ; Bleeker et Kende, 2000)

La mort cellulaire programmée

La manifestation observable de la réponse hypersensible est l'apparition de lésions nécrotiques au site d'infection. Plusieurs évidences suggèrent que ces lésions sont dues à une mort cellulaire programmée, un mécanisme qui ressemble à l'apoptose chez d'autres cellules eucaryotes (Lam et al., 2001). Premièrement, la production de ROS et l'augmentation intracellulaire de calcium sont des inducteurs communs de la réponse hypersensible et de l'apoptose (Gilchrist, 1998). Deuxièmement, une fragmentation de l'ADN nucléaire a été observée lors du traitement avec un éliciteur ou lors d'une interaction

incompatible (Ryerson et Heath, 1996 ; Wang et al., 1996). Tout comme dans l'apoptose, un contrôle génétique de la mort cellulaire programmée a été mis en évidence par l'isolement de mutants (Wolter et al., 1993 ; Greenberg et al., 1994). Finalement, des évidences récentes démontrent une implication de la mitochondrie dans l'initiation de la mort cellulaire programmée (Lam et al., 2001).

1.3.3 Réponse systémique acquise

La résistance locale à l'infection engendre la synthèse de l'acide salicylique qui à son tour est impliquée dans l'induction d'une réponse systémique appelée réponse systémique acquise (SAR, «systemic acquired resistance»). L'activation de cette réponse amène une résistance systémique à un vaste spectre d'organismes (Ryals et al., 1996). Ainsi, l'activation de la SAR protège les plantes contre divers mycètes, bactéries et virus (Uknes et al., 1992). La manifestation biochimique de la SAR est difficile à distinguer de la réponse hypersensible puisqu'elle est induite suite à cette dernière. De plus, la SAR est responsable du maintien de la résistance ce qui implique que plusieurs gènes exprimés lors de la SAR codent pour des protéines PR (Ward et al., 1991). Ce type de résistance nécessite le transport d'une molécule du site d'infection vers des parties distantes de la plante.

Plusieurs évidences biochimiques et génétiques démontrent que l'acide salicylique est synthétisé en grande quantité au site d'infection et que sa production est requise pour l'expression de la SAR (Chen et al., 1995). Suite à l'infection, une grande quantité d'acide salicylique se retrouve dans le phloème et se propage aux tissus avoisinants non-infectés (Métraux et al., 1990 ; Mölders et al., 1996). Cependant, plusieurs évidences démontrent que l'acide salicylique n'est pas le signal mobile impliqué dans la SAR (Vernooij et al., 1994). Le mécanisme par lequel l'augmentation de l'acide salicylique induit la SAR est encore inconnu mais certaines composantes qui agissent en aval de ce

signal ont été isolées. En effet, des mutations dans le gène *npr1* (ou *nim1*) ne bloquent pas l'accumulation de l'acide salicylique en réponse à l'infection mais ces mutants ne peuvent transcrire les gènes de la SAR (Cao et al., 1994 ; Delaney et al., 1995). Ainsi, les plantes mutantes dans le gène *npr1* accumulent plus d'acide salicylique que les plantes sauvages mais leur niveau d'expression des gènes *PR* ainsi que leur résistance aux pathogènes sont fortement diminués. La localisation nucléaire de NPR1 et son interaction avec les facteurs de transcription TGA indiquent que la protéine pourrait influencer la transcription des gènes de la SAR (Després et al., 2000; Subramaniam et al., 2001). Ceci est d'autant plus important depuis que les TGA ont été impliqués dans l'induction des gènes *PR* suite à l'application d'acide salicylique (Jupin et Chua, 1996; Lebel et al., 1998).

1.3.4 Modèle de régulation de la réponse de défense

La figure 1 résume ce que nous savons des mécanismes impliqués lors de la réponse de défense. Les plantes reconnaissent le pathogène qui tente de les infecter par le biais d'une molécule produite par celui-ci que l'on appelle éliciteur. Cette reconnaissance se fait par un récepteur que l'on croit être le produit d'un gène de résistance. S'ensuit une dépolarisation membranaire qui laisse entrer un flux de calcium. Instantanément, une production massive de superoxydes (ROS) et d'oxyde d'azote (NO) débute le processus de défense. Un réarrangement du métabolisme, que l'on appelle le métabolisme secondaire, produit des composés phénoliques qui ont une activité antimicrobienne et d'autres qui renforcent la paroi cellulaire. De plus, le métabolisme secondaire initie la synthèse des hormones de défenses, tels l'éthylène et les jasmonates. Ces composés volatiles induisent les gènes de défense lors de la résistance locale et participent aussi à la transmission du signal pour la résistance systémique ainsi que la communication inter-individus, peut-être même inter-espèces. Une de ces hormones, l'acide salicylique, est induite rapidement suite

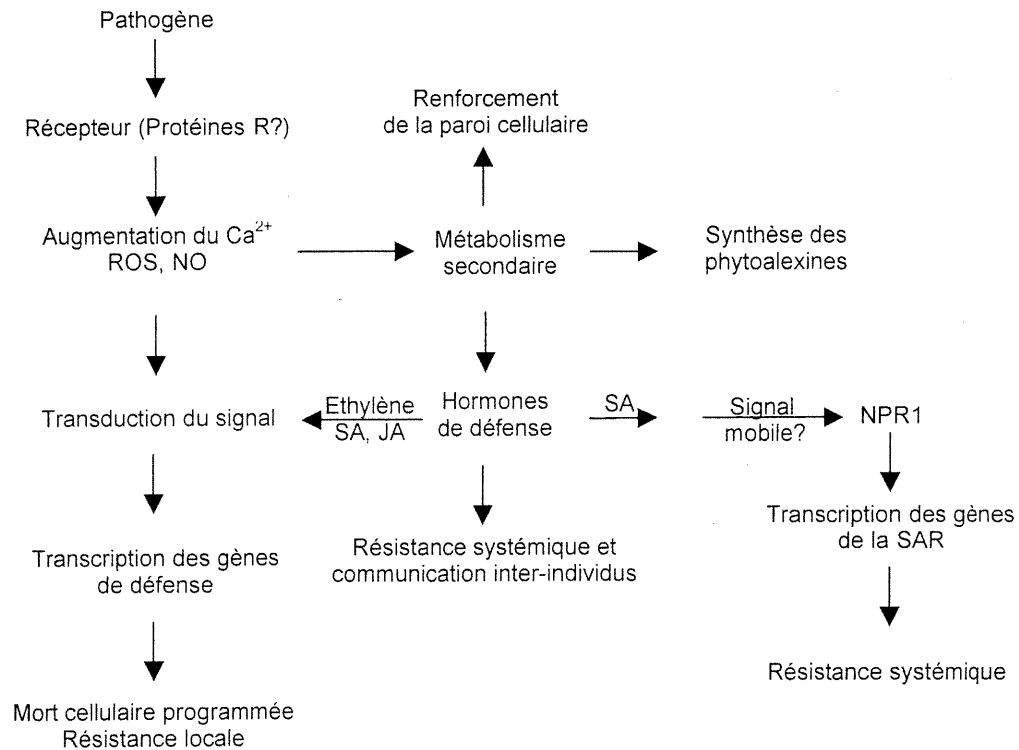


Figure 1. La signalisation cellulaire lors de la réponse de défense

à la détection du pathogène et sert d'intermédiaire dans la transmission du signal pour la résistance locale et est requise via NPR1 pour l'expression des gènes de la réponse systémique. Pendant le réarrangement du métabolisme, s'entame une pléiade de signaux cellulaires de phosphorylation qui amènent la transcription des gènes de défense qui sont essentiels pour la résistance locale à l'infection.

1.4 Contrôle transcriptionnel de l'expression génique

Les mécanismes généraux de la transcription par l'ARN polymérase II sont conservés au cours de l'évolution et les principes généraux de la transcription

par l'ARN polymérase II décrits dans cette thèse sont applicables autant aux eucaryotes unicellulaires qu'aux organismes multicellulaires.

1.4.1 L'ARN pol II

La transcription dépendante de l'ARN polymérase II requiert l'assemblage de plusieurs protéines au promoteur. La figure 2 illustre l'assemblage in vitro au promoteur du complexe d'initiation de la transcription. L'initiation de la transcription requiert la reconnaissance de la boîte TATA par le facteur TFIID. Ce dernier contient la protéine liant la boîte TATA (TBP) et ses facteurs associés. TFIIIB interagit par la suite avec le facteur TFIID lié à la boîte TATA. Il est aussi responsable d'attirer l'ARN polymérase au complexe d'initiation via une interaction avec TFIIIF pour former le complexe d'initiation minimal. Suite à l'action combinée de TFIID, TFIIIB et TFIIIF la polymérase est maintenant bien positionnée au promoteur et peut, dans des conditions précises, initier la transcription (Parvin et Sharp, 1993). Le recrutement de TFIIIE permet l'ajout subséquent de TFIIH pour former le complexe d'initiation complet. Ce dernier est capable de toutes les fonctions associées à l'ARN polymérase II c'est-à-dire l'élongation d'une chaîne d'ARN sur un modèle ADN ainsi qu'une activité hélicase ADN dépendante de l'hydrolyse de l'ATP.

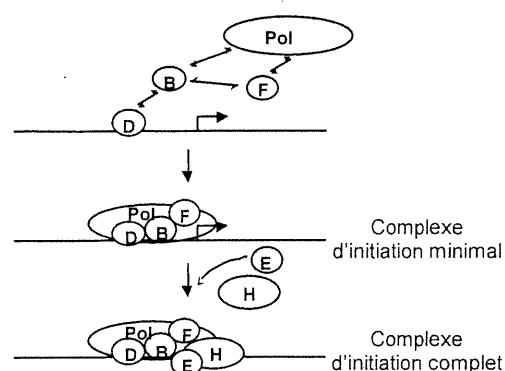


Figure 2. Assemblage de l'ARN polymérase II au promoteur

L'expression spatio-temporelle d'un gène est sous le contrôle de plusieurs facteurs dont la topologie de l'ADN, les activateurs et les répresseurs de la transcription.

1.4.2 La topologie de l'ADN

La structure double hélice en torsade de l'ADN impose une première contrainte structurale à la transcription. En effet, la synthèse d'ARN nécessite l'ouverture de la structure en double hélice ce qui requiert de l'énergie et l'action de gyrases et d'hélicases. De plus, le mouvement de l'ARN polymérase lors de la synthèse d'ARN codant provoque la formation de surenroulement négatif en amont et du surenroulement positif en aval de la polymérase (Giaver et Wang, 1988). Ce stress torsionnel provoque la formation de structures d'ADN inhabituelles, tels les cruciformes, l'ADN-Z et des triplex ADN, qui peuvent gêner la transcription (van Holde et Zlatanova, 1993)

L'association des histones à l'ADN pour former les nucléosomes impose une autre contrainte structurale au bon fonctionnement de la transcription. En effet, cette stabilisation de l'ADN bloque l'accès à l'ARN polymérase qui résulte en une répression de la transcription (Owen-Hughes et Workman, 1994). Il existe cependant des mécanismes contrôlant la stabilité des nucléosomes. Les histones désacétylases favorisent l'assemblage des nucléosomes et sont souvent recrutées à l'ADN pour réprimer la transcription (Ng et Bird, 2000). Par contre, les histones acétyl-transférases ajoutent un groupement acétyle aux histones, ce qui cause une déstabilisation des nucléosomes et favorise, par le fait même, la transcription (Luger et Richmond, 1998). En plus des modifications covalentes mentionnées ci-haut, les nucléosomes sont sujets à des changements conformationnels, effectués par Swi/Snf et Rsc chez la levure, qui repositionnent les histones sur l'ADN dans la chromatine. Cependant, l'effet sur la transcription de ces changements conformationnels demeure inconnu (Lee et Young, 2000).

1.4.3 Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont généralement composés de trois domaines fonctionnels: un domaine de liaison à l'ADN requis pour la reconnaissance et la fixation à l'élément de régulation, un domaine de multimérisation requis pour la formation d'homo- ou hétéromultimères et un domaine d'activation requis pour stimuler la transcription. Il faut voir ces différentes composantes de façon modulaire et un différent agencement peut générer de nouveaux facteurs (Tijan et Maniatis, 1994). Les facteurs de transcription sont classés en familles selon la structure de leur domaine de liaison à l'ADN ou de multimérisation (Pabo et Sauer, 1992 ; Luscombe et al., 2000).

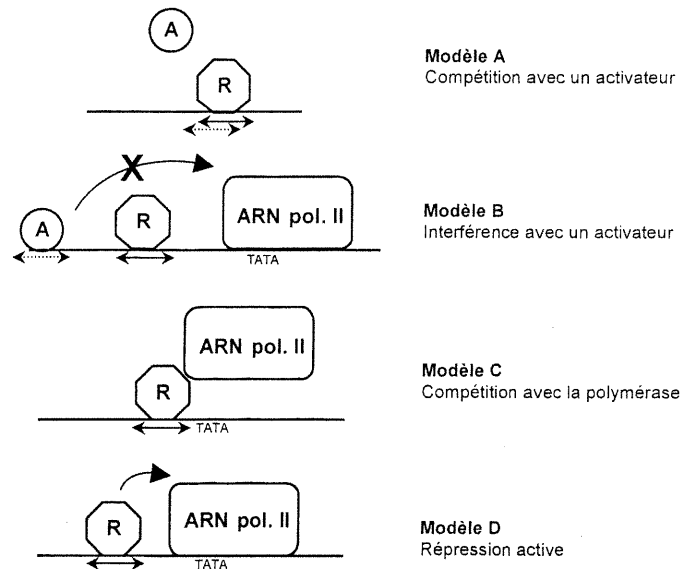
L'expression des gènes requiert un contrôle serré de l'activité des facteurs de transcription. Pour ce faire, il existe plusieurs mécanismes qui contrôlent non seulement l'activité mais aussi la quantité des facteurs de transcription. La quantité de facteurs de transcription peut être régulée à plusieurs niveaux, c'est-à-dire au niveau de la transcription, de la maturation et stabilité des ARN messagers ou de la traduction sans oublier la protéolyse (Calkhoven et Ab, 1996). Une fois le facteur synthétisé, son activité est souvent contrôlée par différents mécanismes. La phosphorylation est la modification post-traductionnelle des facteurs de transcription la mieux caractérisée. Elle peut influencer la localisation cellulaire du facteur, sa capacité à lier l'ADN ou encore ses interactions avec d'autres composantes de la machinerie transcriptionnelle (Hunter et Karin, 1992). L'activité des récepteurs stéroïdiens est pour sa part modulée par la liaison de ligands hormonaux qui provoquent un changement de conformation permettant la liaison à l'ADN (Steinmetz et al., 2001). D'autres facteurs de transcription doivent recruter un facteur accessoire pour pouvoir communiquer avec l'ARN polymérase. Ce mécanisme est exemplifié par le recrutement de CBP par CREB suite à une augmentation du niveau d'AMP cyclique (Shaywitz et Greenberg, 1999).

1.4.4 La répression

Il existe plusieurs exemples de répression transcriptionnelle dans la littérature. A partir de ces exemples, il est possible d'élaborer différents modèles pour la régulation négative de la transcription. Ces différents modèles sont illustrés à la figure 3. Le modèle le plus simple de répression de la transcription est lorsqu'un répresseur entre en compétition avec un activateur pour la liaison à un site unique ou à des sites différents qui se superposent (figure 3, modèle A). Ce type de répression affecte l'expression du gène *eve2* lors du développement des segments de la drosophile (Small et al., 1991) et contrôle

Figure 3. Modèles de répression

Les différents modèles de répression sont représentés. Ils illustrent les différentes interactions entre les activateurs (A), les répresseurs (R) et l'ARN polymérase II (ARN pol. II). Les sites de liaison du répresseur et de l'activateur sont représentés par une ligne pleine et une ligne pointillée respectivement. La description des modèles se trouve dans la section 1.4.4 traitant de la répression.



l'expression du gène de la fibronectine chez le rat (Susuki et al., 1995). Un autre modèle de répression implique la neutralisation d'un activateur (modèle B). Dans ce cas, le répresseur n'empêche pas la liaison de l'activateur à l'ADN mais inhibe sa capacité d'activer la transcription en bloquant les contacts avec l'ARN polymérase (holoenzyme). Ce mécanisme de répression intervient lors de la détermination du sexe chez la levure (Keleher et al., 1988).

D'autres répresseurs ne bloquent pas toujours l'action d'un activateur mais interfèrent plutôt avec la machinerie transcriptionnelle de base. Un mécanisme similaire au modèle A est utilisé par certains répresseurs pour bloquer cette fois-ci la formation du complexe d'initiation minimal (modèle C). Pour ce type de répression, l'élément lié par le répresseur doit être à proximité de la boîte TATA (Austin et Biggin, 1995 ; Stubenrauch et al., 1996). Finalement, le modèle D illustre la répression active ou le répresseur, par un mécanisme similaire à l'activation de la transcription, agit sur l'ARN polymérase pour altérer son activité via un domaine de répression spécifique. Les domaines de répression active sont très divergents et peuvent être regroupés en trois catégories : les domaines riches en alanine, ceux riches en proline et les domaines chargés (Hanna-Rose et Hansen, 1996). Un domaine de répression active unique aux plantes vient tout juste d'être identifié (Ohta et al., 2001). Ce domaine contient le motif (L/F)DLN(L/F)XP, qui est présent chez plusieurs répresseurs de la transcription de plantes.

D'autres types de répression ne sont pas illustrés car ils ne requièrent pas la liaison du répresseur à l'ADN. Le répresseur I κ B retient le facteur de transcription NF κ B dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible (Baeuerle et Baltimore, 1988). On parle ici de la titration d'un facteur qu'il faut différencier de la co-répression où le co-répresseur dépend de l'interaction avec une protéine liant l'ADN pour réprimer la transcription (Carlson, 1997).

1.5 But et problématique de cette thèse

Le but de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle de la réponse de défense chez les plantes. Bien que plusieurs éléments de cette réponse soient connus, il manque encore plusieurs pièces au casse-tête. L'approche génétique utilisée par plusieurs groupes amène beaucoup d'information mais les preuves biochimiques essentielles à la

confirmation des modèles proposés sont souvent peut convaincantes, rendant difficile l'intégration de l'information.

L'approche qui est utilisée dans cette thèse est de partir d'une extrémité de la réponse de défense et de remonter le courant par des approches biochimiques. Ainsi mes prédécesseurs ont établi le système modèle du gène *PR-10a*. Ils ont démontré que le gène *PR-10a* de la pomme de terre, précédemment appelé *STH-2*, est induit suite à l'attaque par l'oomycète *Phytophthora infestans* ou suite à l'application d'un éliciteur lipidique, l'acide arachidonique, provenant de la membrane de *P. infestans* (Marineau et al., 1987 ; Matton et Brisson, 1989). De plus, ils ont démontré que le produit du gène *PR-10a* s'accumule plus rapidement et en plus grande quantité dans les tissus infectés par une race incompatible que dans ceux infectés par une race compatible, ce qui suggère que *PR-10a* est induit lors de la réponse hypersensible dépendante d'un gène R (Constabel et Brisson, 1992). Par la suite, l'isolement de la région promotrice de *PR-10a* leur a permis de caractériser quelques éléments de régulation autant par des études d'expression transitoire que par l'étude de plants transgéniques (Matton et al., 1993 ; Després et al., 1995). Puis, certains de mes collègues ont décidé d'aller à un niveau supérieur et ont entrepris la caractérisation de l'élément de réponse à l'éliciteur et des facteurs qui s'y lient. Ils ont trouvé que le facteur PBF-2 peut se lier de manière séquence spécifique à un élément de réponse à l'éliciteur (Després et al., 1995 ; Desveaux et al., 2000).

L'étude de la régulation de *PR-10a* ne pouvait être complète sans l'étude d'un autre élément important situé dans son promoteur. Ce dernier, un élément de régulation négatif appelé «silencing element» (SE), garde le niveau d'expression de *PR-10a* entre 10 à 20 pour cent de son niveau d'expression maximal (Matton et al., 1993 ; Després et al., 1995). Plusieurs questions avaient alors besoin de réponses. Quels sont les facteurs qui lient cet élément ? Est-ce que la régulation négative affecte d'autres gènes de défense ? Est-ce que les protéines qui participent à la régulation de *PR-10a* participent aussi à la

régulation de ces autres gènes ? Quels sont les mécanismes qui contrôlent cette répression ? Agit-elle de manière constitutive ou est-elle régulée ? C'est à ce moment que j'ai entrepris, avec d'autres collègues, la caractérisation du SE et d'un facteur qui s'y lie, SEBF.

L'approche utilisée consiste à caractériser en premier lieu les nucléotides importants pour l'activité du SE. En ayant en main un site de liaison potentiellement bien caractérisé, il était clair que nous devions nous lancer dans la recherche d'un facteur nucléaire qui pouvait lier cet élément avec la même spécificité de séquence. Cette approche amena l'identification de SEBF, un facteur qui lie de manière séquence spécifique un seul brin du SE. La caractérisation du site de liaison de SEBF a permis d'identifier d'autres gènes de défense qui pourraient aussi être contrôlés par ce facteur. SEBF fut purifié à partir de noyaux de tubercules, ce qui permit d'établir une séquence amino-terminale et d'isoler ainsi un ADNc correspondant à SEBF. L'analyse de la séquence de SEBF a révélé la présence de motifs de liaison à l'ARN du type cs-RBD (« consensus sequence type RNA binding domains »). Cette analyse a aussi révélé la présence d'une extension amino-terminale qui possède toutes les caractéristiques d'une séquence transit pour l'importation aux chloroplastes. En fait, SEBF possède une grande similarité de séquence à des protéines chloroplastiques liant l'ARN. La surexpression de SEBF dans un système d'expression transitoire a permis de confirmer sa participation dans la répression du gène *PR-10a*. Finalement, plusieurs outils ont été développés au cours de mes travaux qui seront utiles pour mieux comprendre le rôle de SEBF dans le contrôle de l'expression de *PR-10a* et de la réponse de défense.

2. Matériel et méthodes

Toutes les procédures habituelles de biologie moléculaire ont été effectuées selon Sambrook et al. (1989)

2.1 Matériel

Les tubercules certifiés de pomme de terre ont été obtenus de la station de recherche Les Buissons du Ministère de l'Agriculture du Québec (Pointe-aux-Outardes, Canada). Les tubercules ont été gardés dans le noir à 4°C et sortis à la température de la pièce 24 h avant leur utilisation. Les protoplastes de feuilles de pomme de terre ont été isolés à partir de plants âgés de 4 à 5 semaines selon la méthode de Magnien et al. (1980). Les feuilles de pomme de terre ont été isolées de plants cultivés en chambre de croissance (Conviron, Winnipeg, Canada) sous des conditions de photopériode longue.

2.2 Construction avec gène rapporteur et essais β -glucuronidase

Le promoteur sauvage a été construit par l'amplification en chaîne de la polymérase (PCR) à partir du plasmide p-135 (Matton et al., 1993) en utilisant les oligonucléotides 1 (5'-GCCAAGCTTTAGATAAAATGACACAAAATG-TCAAAAATGG-3') et 2 (5'-CCACCCGGGGATCCAGCTTTGAAC-3') pour remplacer le site XbaI à la position -135 par un site HindIII. Après digestion avec HindIII et BamHI, le fragment a été inséré dans le vecteur pBI201. Le mutant m1 a été décrit précédemment (pLP9, Desveaux et al., 2000). Les mutants m3, m4 et m5 ont été créés par PCR en utilisant les oligonucléotides mutants présentés à la figure 6A et l'oligonucléotide 2. Après digestion avec XbaI et BamHI, les

fragments ont été insérés dans la construction sauvage décrite plus haut. Pour le mutant m2, un fragment HindIII-NcoI a été amplifié en utilisant les oligonucléotides 1 et 3 (5'-CAGTCCATGGTTAAAATCAAC-3'). Par la suite, un fragment NcoI-BamHI a été amplifié en utilisant les oligonucléotides 2 et 4 (5'-TAACCATGGACTGTCACTT-3'). La ligation de ces deux fragments dans un vecteur pBI201 digéré avec HindIII et BamHI a créé le mutant m2. Les amplifications ont été effectuées dans un appareil T-Gradient de la compagnie Whatman/Biometra. La séquence de toutes les constructions a été déterminée pour s'assurer qu'aucune mutation n'a été insérée lors de l'amplification. Le système d'expression transitoire a été décrit précédemment (Matton et al., 1993). Toutes les valeurs ont été corrigées pour l'efficacité d'électroporation en mesurant l'activité luciférase résultant de la coélectroporation de 1 µg du plasmide pWB216 (Barnes, 1990).

La séquence codante pour le précurseur de SEBF (preSEBF) a été insérée dans le vecteur pBI223D sous le contrôle du promoteur 35S avec deux «enhancers» du virus de la mosaïque du chou-fleur. Pour les expériences de transrépression, 5 µg de vecteur d'expression ont été ajoutés dans les essais. Le vecteur contrôle exprimait une protéine de fusion contenant la protéine FKBP (FK506 binding protein; Pelletier et al., 1998) sous le contrôle du même promoteur.

2.3 Préparation des extraits

Les extraits nucléaires ont été préparés comme suit : 200 g de pomme de terre ou 75 g de feuilles ont été homogénéisés avec un mélangeur à la vitesse maximale pendant 1 minute dans 250 ml de tampon NEBH froid (10 mM Pipes-KOH, pH 6,0, 1 M 2-méthyl-2,4-pentanediol, 150 µM spermine, 500 µM spermidine, 10 mM MgCl₂, 14,3 mM β-mercaptoéthanol et 100 µM phénylméthylsulfonyl fluoride). Après 5 minutes de décantation à 4°C, l'homogénat a été filtré au travers de 5 couches de Miracoth puis centrifugé à

4000g pendant 5 minutes dans un rotor GSA de Sorvall. Suite à la centrifugation, le surnageant a servi de fraction cytoplasmique et le culot contenait les noyaux. Les noyaux ont été lavés trois fois dans le tampon NP-40 (10 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 260 mM sucrose, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 150 μ M spermine, 500 μ M spermidine, 14,3 mM β -mercaptoéthanol, 0,1 % BSA et 1 % Nonidet P-40) pour enlever les organelles et le cytosquelette. Suite au dernier lavage, les noyaux ont été remis en solution dans 5 mL de tampon de liaison pour SEBF 200 mM NaCl (SBB : 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 14,3 mM β -mercaptoéthanol et des concentrations variables de NaCl). Les noyaux ont été brisés à l'aide d'ultrasons et le lysat centrifugé à 19 000 g pendant 45 minutes. Le surnageant a été utilisé immédiatement pour la purification de SEBF ou congelé à -70°C en présence de 10 % glycérol. Dans de telles conditions, l'activité de liaison à l'ADN de SEBF est demeurée stable pour plusieurs mois. Les chloroplastes ont été isolés d'après la méthode de Gegenheimer (1990).

2.4 Détermination des activités enzymatiques dans les extraits

Le niveau de chlorophylle a été mesuré selon Arnon (1949). Les activités de la pyrophosphatase alcaline, de la nitrite réductase et de l'alcool déshydrogénase ont été déterminées selon les méthodes de Gross et ap Rees (1986), Hucklesby et al. (1972) et Smith et ap Rees (1979), respectivement.

2.5 Retardement sur gel

Les extraits protéiques (dans du SBB 200 mM NaCl) ont été mélangés avec 20 000 CPM d'une sonde marquée au 32 P à l'aide de la polynucléotide kinase (MBI-Fermentas). La réaction de liaison (40 μ L) contenait 100 ng de poly(dI-dC) pour éliminer les réactions non spécifiques. La réaction a été incubée sur glace 15 minutes pour être chargée subséquemment sur un gel de

5,7 % de polyacrylamide préparé dans du tampon Tris-glycine (25 mM Tris, 195 mM glycine). La migration des complexes dans le gel a été effectuée par l'application de 200 V pendant 2 h 30 à 4°C. Après séparation du montage, le gel a été exposé sur un film Kodak X-Omat AR pour la nuit à -70°C.

2.6 Purification de SEBF à partir d'extraits nucléaires

Les extraits nucléaires ont été chargés sur une colonne de chromatographie liquide rapide de protéine (FPLC) Q-sépharose de 3 mL équilibrée dans du SBB 200 mM NaCl. La colonne a été lavée par la suite avec 10 volumes de SBB 200 mM NaCl et 15 volumes de SBB 300 mM NaCl. SEBF a été élué de la colonne avec 4 mL de SBB 400 mM NaCl. Les protéines ont été par la suite soumises à deux rondes de purification par affinité. Les colonnes d'affinité ont été préparées par la liaison d'un oligonucléotide sauvage couplé à de la biotine à des billes paramagnétiques recouvertes de streptavidine (Desveaux et al., 2000). Les billes ainsi préparées ont été lavées deux fois avec du SBB 400 mM NaCl avant l'utilisation. A 1 mL de protéines ont été ajoutés 20 μ L de EDTA 500 mM pH 8,0, 10 μ g de poly(dI-dC) et 5 μ L de Nonidet P-40. Le mélange a été ajouté aux billes et laissé sur glace 15 minutes pour permettre la liaison de SEBF à l'oligonucléotide. Après la séparation des billes de la solution avec un aimant, elles ont été lavées avec 1 mL de 200 mM SBB suivi d'un lavage avec 1 mL de SBB 1 M NaCl. SEBF a été séparé de la colonne par deux éluations subséquentes consistant en l'addition de 100 μ L de SBB 2 M NaCl et l'incubation à 37°C pendant 5 minutes. Le NaCl a été enlevé des protéines par l'utilisation de filtre de centrifugation 10K Ultrafree 4 (Millipore, Bedford, MA). Les protéines issues d'un kg de tubercules ont été regroupées puis précipitées à l'acétone. Les protéines du culot ainsi obtenu ont été solubilisées dans du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) et chargées sur un gel SDS-PAGE de 12 %. Les protéines ont été transférées sur membrane de difluorure de polyvinylidène (Bio-Rad) et colorées au bleu brillant de Coomassie R-250. Les bandes de

protéines ainsi révélées ont été coupées et envoyées au Service de Séquençage de Protéines de l'Est du Québec (Ste-Foy, Canada) pour l'analyse amino-terminale. Une séquence de 50 acides aminés a été obtenue suite à l'analyse de la protéine de 29 kD (voir figure 5). Les 10 derniers acides aminés possédaient cependant des contaminations mineures. La procédure de Southwestern a été décrite auparavant (Vinson et al., 1988).

2.7 Clonage de SEBF

Deux oligonucléotides dégénérés correspondants aux acides aminés 1 à 8 (5'-GTKACWYTITCIGATTTYGAYCA-3') et aux acides aminés 41 à 46 (5'-ARRTTWCCACRAARATYTT-3') de la protéine purifiée ont été utilisés pour isoler un fragment d'ADN génomique de 141 paires de bases par PCR. Un oligonucléotide spécifique (5'-GTTGAGTGATGAAGGTGC-3') dérivé du fragment amplifié a été utilisé par la suite pour rechercher dans une banque d'ADNc (Matton et al., 1989) un clone de SEBF par la méthode d'Israel (1993). Vingt-trois ensembles de 18000 phages ont été utilisés dans des réactions de PCR avec l'oligonucléotide spécifique à SEBF et l'oligonucléotide universel M13. Deux ensembles ont donné un signal d'environ 1000 paires de bases. Ces ensembles ont été dilués et la procédure répétée jusqu'à l'obtention d'une seule plage de lyse. Un clone positif a été excisé en utilisant le système ExAssist (Stratagene) selon les instructions du manufacturier. La séquence du clone a été déterminée sur les deux brins par une réaction de séquençage cyclique utilisant la ThermoSequenase (Amersham Pharmacia Biotech) qui a été analysée par la suite sur un séquenceur automatique Li-Cor. La séquence de SEBF est déposée dans GenBank sous le numéro d'accès AF389431.

2.8 Analyse génomique de SEBF

Les procédures d'extraction d'ADN génomique et d'hybridation de type Southern ont été effectuées telles que décrites dans Ausubel et al. (2001). Les oligonucléotides suivants ont été élaborés selon la position des introns dans les homologues de SEBF chez *Arabidopsis* et le tabac (Ye et al., 1991; Ohta et al., 1995) et utilisés dans des réactions de PCR avec l'ADN génomique : **T** (5'-GCC-GTTCTGCTTCACAATTCTTTTGCTTC-3'), **U** (5'-CAACATCTCCAGCAGCT-CAAAAGCTCAG-3'), **V** (5'-CCTCTGCTTCTTCCTGTAAGCTTGTCATAG-3'), **W** (5'-CAGTTGAAGCCGCCTGTCAACAATTTAATG-3'), **X** (5'-TTGACGGGAGG-GCACTGAGGGTGAATTCTG-3'), **Y** (5'-CGCTTTCAATTGCATCGTTGAC-CTCCTTAG-3') et **Z** (5'-GCTTCAGCAGGACTTACACGGATGGCCCTG-3').

2.9 Production d'anticorps et immunobuvardage

L'ADNc codant pour la version mature de SEBF a été fusionné au gène de la glutathione-S-transférase (GST) dans le plasmide pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia Biotech). La protéine de fusion exprimée dans *Escherichia coli* a été purifiée sur une colonne de glutathione (Smith et Johnson, 1988). La queue GST a été coupée à la thrombine (Amersham Pharmacia Biotech) puis séparée de SEBF par un deuxième passage sur la colonne de glutathione.

L'immunisation des lapins pour la production d'anticorps a été effectuée selon la procédure décrite dans Harlow et Lane (1988). Pour l'immunobuvardage, le sérum anti-SEBF a été utilisé à une dilution de 1 :5000 et l'interaction anticorps-antigène a été révélée par le système de détection ECL (Amersham Pharmacia Biotech) en suivant les instructions du manufacturier. Les anticorps contre les histones H1 et Cdc2 ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

3. Résultats

3.1 Les protéines majeures du latex sont des PR-10*

Les protéines PR-10 ont été identifiées chez un grand nombre d'espèces végétales. Cependant, aucune annotation de PR-10 n'apparaît suite à la publication de la séquence complète du génome d'*Arabidopsis*. Ceci nous poussa à vérifier s'il existait une protéine d'*Arabidopsis* similaire à la protéine PR-10a de pomme de terre. Une recherche avec le programme BLAST (Altschul et al., 1997) sur une base de données non redondante en spécifiant l'organisme *Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier une famille de protéines possédant 20 à 30 pour-cent d'identité de séquence avec PR-10a. Les protéines de cette famille ont été annotées comme des protéines majeures du latex (MLP) suite à leur homologie de séquence avec les protéines majeures du latex du pavot (*Papaver somniferum*). Une autre recherche BLAST, cette fois-ci avec une MLP d'*Arabidopsis* a permis d'identifier plusieurs autres MLPs chez d'autres espèces de plantes comme le poivron, le melon et le concombre (résultats non présentés). Toutes ces protéines possèdent une plus grande similarité de séquence entre elles qu'avec les PR-10 (résultats non présentés). La similarité des MLPs avec les PR-10 avait été remarquée auparavant mais la faible identité de séquence ne permettait pas à elle seule d'établir le lien entre les deux familles (Pozueta-Romero et al., 1995).

La figure 4 montre un alignement de 12 PR-10 avec 6 MLP. Il faut noter qu'un échantillonnage de chacune des familles est présenté pour plus de clarté. L'alignement, qui est basé sur 94 PR-10 et 13 MLP, a été effectué avec le programme CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) et ajusté selon la structure de

* Les résultats présentés dans cette section ont été publiés. P.Osmark, B.Boyle et N. Brisson (1998). *Sequential homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. Plant Mol. Biol.* **38**: 1243-1246.

Figure 4. Alignement de 12 PR-10 avec 6 protéines majeures du latex (MLP, indiquées en gris).

L'alignement est basé sur les séquences de 94 PR-10 et 13 MLP. Seulement un échantillonnage de chaque famille est présenté pour plus de clarté. Les acides aminés qui sont conservés dans plus de 90 % des séquences sont indiqués en noir. Les positions où se retrouvent un acide aminé à chaîne latérale non-polaire sont indiquées en gris, celles pour les résidus polaires sont encadrées. Sous l'alignement on retrouve les éléments de la structure de Bet v 1 en plus de retrouver les prédictions de structure pour les PR-10 et MLP effectuées par le programme PHD (E: conformation étendue de feuillet β ; H: conformation hélicoïdale d'hélice α). La numérotation des acides aminés est selon la séquence de Bet v 1. Les protéines proviennent des organismes suivants avec leur code d'accèsion NCBI: Bet v 1 (*Betula verrucosa*), gi542869; Mald1 (*Malus domestica*), gi131967; Apig1 (*Apium graveolens*), gi763063; PcPR-1 (*Petroselinum crispum*), gi130822; PvPR1 (*Phaseolus vulgaris*), gi21043; SAM22 (*Glycine max*), gi18743; LIR 18A (*Lupinus luteus*), gi103933; Srg1 (*Medicago sativa*), gi136332; DRRG-49C (*Pisum sativum*), gi18934; PR-10a (*Solanum tuberosum*), gi169550; PBZ1 (*Oryza sativa*), gi1215811; AoPR1 (*Asparagus officinalis*), gi16078; MLP1 (*Arabidopsis thaliana*), gi2129641; MEL7 (*Cucumis melo*), gi1843442; MLP (*Papaver somniferum*), gi294060; 16,5 kD (*Nicotiana tabacum*), gi82170; Sn-1 (*Capsicum annuum*), gi2129926; 17kD (*Fragaria vesca*), gi2465015.

Bet v1 bouleau
Mald 1 pomme
Apig 1 céleri
PcPR-1-1 persil
PvPR 1 fève
SAM 22 soja
LIR18A lupin
Srg1 alfalfa
DRRG-49C pois
PR-10a p. de terre
Os PBZ1 riz
AoPR1 asperge
MLP1 Arabidopsis
MEL7 melon
MLP opium
16.5 kD tabac
Sn-1 poisiron
17 kD fraise

1 10 20 30 40 50 60 70
---GVF-NYETE-TTSSVIPAAARLKKAFILDGDNLFPKVAAP-QA-SVVENIE-NGGP---STIKKISFIPE-GLPFKYVKDRVDE
---MGVF-NYETE-TTSSVIPARLKKAFILDGDNLFPKVAAP-QA-KSVEIEEGDGGV---GTTKKIKVTFGE-GSQYGYVKQRVNG
---MGVQ-THELE-TTSSVSAEKIFQGFILDGDNLVKKAAP-GAYKSVEIK-GDGGP---GTTKKTILPD-GGPI TMTLRIDG
---MGVF-TFEDQ-TTSPVAPATLYKAVAKDADTIFPKALP-DSFKSVEIIEGNGGP---GTTKKTIVHLGD-ASPFKTMKQKQVDA
---MGVF-TFENEQSSVAPAKLYKALVTKDSDNI PKVI--EPQSVIEIIEGNGGP---GTTKKTIFLE-DGETKFLVHKIES
---MGVF-NFEDETTISIVAPARLYKALVTDSDNLPKVI--DAQSVIEIIEGNGGA---GTTKKTIFVE-GGETKFVLLHKLDA
---MGVT-NFEHEATTSIVAPATLYKALVTDSDNLPKVI--DAKSVIEIIEGNGGP---GTTKKTIFVE-GGETKFVLLHKLDA
---MAPA-CVEHEHTTIVAPATLYKALVTDSDNLPKLM---PQVKNIEAEDG---GTTKKTIFVE-GGETKFVLLHKLDA
---MSSG-TWEHEAVNVAAGRMFKAFVDA-STLPKACA-GLVDIAVE-3NGGGP---GTTKKTIFVE-GGETKFVLLHKLDA
---MATSGETEVEPLKGSAKNFKRWKSEN-QLFPDAIG-HHIQGVTVHE3DWDSH---GTTREIKNNPAIPF5YVYKERLDF
---MSLIGKLESELEINAAAEKFEFKDQC-FQVNTIP-RCIQQVEIHGTNWDGHHGCSIKSWYTI-DGKQEVFKEKRE-
MAHTHCISGLVGLKLEMESEVNCNADKYKLYK-KH-EDLPSVIP-HIYTSVKAVE3HGTTS---GCVKEWGYI-EGKPLSCKEKITV-
---MGLKGLLEAQIEMKACAGDLLHEHFKSNP-HQTSITMSP-NKINTNFTLHEQLGST---GSVVS3WKFV-LGGKERHAKQV LH-
---MGVKGKLEASVEVKCEGNLIEHFIHA-HHVPNITSP-NFINHFEIHEGETVKV---GSVVS3WYNE-AGQKRYMKQLIED
---MSLQKVEAEFEITAPADKFNIEFKIEA-HLVPNITSP-NFINHFEIHEGETVKV---GSVVS3WYNE-AGQKRYMKQLIED
---MSLQKVEAEFEITAPADKFNIEFKIEA-HLVPNITSP-NFINHFEIHEGETVKV---GSVVS3WYNE-AGQKRYMKQLIED

Structure Bet v 1
PHD, PR-10
PHD, MLP

α1 α2 β2 β3 β4
EEEEEE EEEEEEE HHHHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
EEEEEE EEEEEEE HHHHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE

Bet v 1 bouleau
Mald 1 pomme
Apig 1 céleri
PcPR-1-1 persil
PvPR 1 fève
SAM 22 soja
LIR18A lupin
Srg1 alfalfa
DRRG-49C pois
PR-10a p. de terre
Os PBZ1 riz
AoPR1 asperge
MLP1 Arabidopsis
MEL7 melon
MLP opium
16.5 kD tabac
Sn-1 poisiron
17 kD fraise

80 90 100 110 120 130 140 150
VDHNTFKYNYSVIEEGPIGDTLLEKISNEIKIVATPDG-GSILKISNKHAKGDIHEVKAQKASKEMGETLRAVEEYLAHSDAYN
DKDNFTYSYSMIEGDTLSDKLEKITIYETKI IASPDG-GSIIKTTSHYHAKGDIHEVKAQKASKEMGETLRAVEEYLAHSDAYN
VKEALTFDYSDI L LGFIESINHHVTVPTADG-GSICKTTAIFHTKGDIAVPEENIKYANEQNTALFKALEAYLIAN-
DKATFTYSYSDI L LGFIESINHHVTVPTADG-GSICKTTAIFHTKGDIAVPEENIKYANEQNTALFKALEAYLIAN-
DEANLGYYSYSDI L LGFIESINHHVTVPTADG-GSICKTTAIFHTKGDIAVPEENIKYANEQNTALFKALEAYLIAN-
DEANLTYYSYSDI L LGFIESINHHVTVPTADG-GSICKTTAIFHTKGDIAVPEENIKYANEQNTALFKALEAYLIAN-
VDDVNFAYNYSYSDI L LGFIESINHHVTVPTADG-GSICKTTAIFHTKGDIAVPEENIKYANEQNTALFKALEAYLIAN-
VDDANWANNYSYSDI L LGFIESINHHVTVPTADG-GSICKTTAIFHTKGDIAVPEENIKYANEQNTALFKALEAYLIAN-
VDDKINLVTKYSMIEGDTLSDKLEKITIYETKI IASPDG-GSIIKTTSHYHAKGDIHEVKAQKASKEMGETLRAVEEYLAHSDAYN
CDAAASHVLKSDIVLEAESKVGKLSHSIETKLEATDGG-SVAKLKVYELEDGSSLSPEKEKDIVDGYGMLKMEDEYLVAHPAEYA
VDHDKFVKQTLVEEGGLGKMFECATTHKFEPSNG-GGLVKVTASYKILPGVA---DESAKAKEGITNHMKAYEAYLANPTAYV
LDDQKMAVTRGLDGH-VMEQLKVDYDFVFPKSQE-GCVCKCTMFEKRYEIDS---PEPIKYMKFVTSLAADMDDHILKNQSKA-
FHDDKLLI VLDGVGD-VFKNYKSFKPAQFVPKDRN-HGQALSIIEYKELHHGSS---PDPHYIDLMI GINTDNGSHIK-
VNDERTIHMVAGD-LMNDYKFFDALTAVNPKSNGHGCIWKVTIDYKMNEDS---PVPFGYLACYQQITEDLSSHLCASD-
IDDAKKSITFNVEED-MNELYKSMIATLTAEGNWT---WTFYKELNENI---PEPLIFELAI CLKDLLEPHHVVGK-
IDPDMKLI RWKALEG-D-VLEISYNSFTIVTSSEHWTT---WTIEYEKKTIEGT---PEPLVLLGLVLDMTKDI EAHLLKK-
LDEVNKTI TLNGLLED-VFQYYSKSFKPIYQFTQKDEG-SSIAKVSIEEKLSEIEV---AAPDKYIRLMTNVKDLDAHFVKA-
LDEVNKTI TLNGLLED-VFQYYSKSFKPIYQFTQKDEG-SSIAKVSIEEKLSEIEV---AAPDKYIRLMTNVKDLDAHFVKA-

Structure Bet v 1
PHD, PR-10
PHD, MLP

β5 β6 β7 α3
EEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE HHHHHHHHHHHH
EEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE HHHHHHHHHHHH

Bet v 1 (Gajhede et al., 1996). Ce qui est apparent au premier coup d'œil est l'uniformité de longueur des protéines qui possèdent entre 145 et 162 acides aminés. En fait, la plupart des protéines semblent commencer à la position correspondant à la Gly₁ de Bet v 1 (dans les cas où l'extrémité N-terminale a été étudiée la méthionine semble être enlevée post-traductionnellement). D'après la structure de Bet v 1, la Gly₁ est impliquée dans la formation de deux ponts hydrogène et ainsi l'extrémité amino-terminale ne peut être rallongée ou écourtée sans affecter grandement la structure.

Seulement quelques acides aminés sont conservés dans les deux familles. Il s'agit des His/Phe/Trp/Tyr₁₉, Pro₃₁, Gly₄₆, Gly₅₁, Gly₈₈, Gly₁₁₁, Cys/Ser₁₁₂, et Phe/Trp/Tyr₁₂₀. Cependant, en considérant uniquement la distribution des résidus polaires (C, D, E, K, N, Q, R, S, T) et non polaires (A, F, I, L, M, P, V, W, Y) le patron général semble très conservé. Une exception est située à l'extrémité C-terminale où la première partie de la dernière hélice alpha, α_3 , est plus divergente. Cette portion est d'ailleurs la moins conservée parmi les PR-10. Il faut aussi remarquer la conservation des résidus hydrophobes à trois locus importants [Ile₉₁, Leu₉₅, Ile₉₈, Tyr₁₂₀], [Ile₃₈, Ile₅₆, Phe₅₈] et [Phe₁₉, Phe₂₂, Ile₁₀₄]. La présence d'une cavité importante dans la structure de Bet v 1 explique l'absence d'un noyau central hydrophobe.

On retrouve sous les alignements à la figure 4 les divers éléments de la structure de Bet v 1 et les prédictions de structure secondaire pour les PR-10 et les MLP. Les prédictions ont été effectuées avec le programme PHD (Rost et Sander, 1993) qui a un taux de réussite supérieur à 70 pour cent. Le programme donne une prédiction pour chaque acide aminé, soit étendu (E), hélicoïdal (H) ou rien du tout. Pour Bet v 1, la prédiction PHD est à 72,3 pour cent en accord avec la structure publiée. La précision de PHD peut être améliorée par l'analyse d'un alignement de séquences (Rost et Sander, 1994). Les prédictions présentées à la figure 4 sont basées sur un alignement de 25 PR-10 ou de 13 MLP. La structure prédite à partir de l'alignement des PR-10 est

à 83,6 pour-cent en accord avec la structure de Bet v 1, et 71,2 pour-cent pour les MLP. Dans les deux cas la présence d'une proline conservée dans l'hélice $\alpha 2$ ne permet pas la prédiction d'une telle structure. Outre ce problème, les structures des PR-10 et MLP sont remarquablement conservées ce qui suggère que ces protéines ont une origine commune. Ceci est supporté par la présence de très peu de brèches lors de l'alignement des séquences primaires.

Les résultats présentés dans cette section procurent assez d'évidences pour conclure que les PR-10 et les MLP font parties d'une seule famille de protéines. Par conséquent, il est permis de croire qu'elles devraient occuper la même fonction dans toutes les plantes. Cette fonction reste toutefois à être élucidée.

3.2 La protéine SEBF réprime la transcription de *PR-10a*[†]

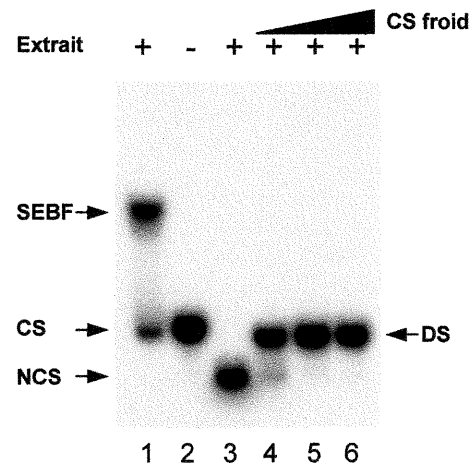
Identification de SEBF

Des études antérieures avaient démontré l'existence d'un élément de régulation négatif (SE) dans le promoteur du gène *PR-10a* (Matton et al., 1993; Després et al., 1995). Pour faire suite à ces travaux, il fallait identifier une ou des protéines nucléaires capables de réguler la transcription de *PR-10a* par la liaison au SE. Suite à l'identification de PBF-2, qui semble activer la transcription du gène *PR-10a* via un élément d'ADN simple brin (Desveaux et al., 2000), il fallait chercher une protéine nucléaire qui pouvait lier soit les formes simples ou double brins du SE. Pour ce faire, un extrait nucléaire a été incubé avec différentes formes du SE et analysé par retardement sur gel. La figure 5 montre la liaison d'un facteur nucléaire (SEBF) au brin codant du promoteur de *PR-10a* (ligne 1). SEBF était incapable de lier le brin non-codant (ligne 3) ou la

[†] Une partie des résultats présentés dans cette section a été publiée. B. Boyle et N. Brisson (2001). *Repression of the defense gene PR-10a by the single stranded DNA binding protein SEBF. Plant Cell* **13**: 2525-2537.

Figure 5. SEBF lie l 'ADN simple brin.

Retardement sur gel effectué avec 10 μg d 'extrait nucléaire et 20 000 CPM de brin codant (CS, lignes 1 et 2) ou non-codant (NCS lignes 3 à 6) du SE marqués au ^{32}P . Le double brins (DS, lignes 4 à 6) a été formé par l'hybridation du brin codant froid avec du brin non-codant radioactif. Le ratio CS:NCS est de 0,75:1, 1,5:1 et 3:1 pour les lignes 4, 5 et 6 respectivement. Aucun extrait n'a été ajouté à la ligne 2. Les flèches indiquent la position des sondes CS, NCS et DS ainsi que la position du complexe SEBF/ADN dans le gel.



forme double brins du SE (lignes 4 à 6). Ces résultats indiquent que SEBF est une protéine liant l'ADN simple brin et qu'elle ne reconnaît qu'un seul brin du SE.

Il existe une corrélation entre la liaison de SEBF au SE et la répression du gène *PR-10a*

Une analyse du SE par mutagenèse a été entreprise pour déterminer quels nucléotides sont importants pour la liaison de SEBF et voir de quelle façon ces mutations influencent la transcription de *PR-10a*. Des oligonucléotides mutants (Figure 6A) ont été synthétisés et leur liaison par SEBF a été étudiée par retardement sur gel (Figure 6B). Ces mutations ont aussi été introduites dans le promoteur de *PR-10a* pour déterminer quels nucléotides étaient importants pour l'activité du SE in vivo (Figure 6D). La figure 6B montre que la liaison de SEBF aux mutants m3 et m4 a été réduite considérablement lorsque comparée à la liaison au brin sauvage. Toutefois, on a observé une augmentation de l'activité du gène rapporteur lors de l'introduction de ces mutations dans le promoteur de *PR-10a* (Figure 6D, m3 et m4). On a aussi remarqué que les mutations qui affectaient peu la liaison de SEBF (Figure 6B, m2 et m5) n'avaient aucun effet sur la transcription du gène rapporteur (Figure 6D, m2 et m5). La liaison de SEBF au mutant m1, dans lequel 80% de la séquence est mutée, a été complètement abolie (Figure 6B, m1) ce qui correspond à la plus haute activité du gène rapporteur (Figure 6D, m1). Par conséquent, l'activité transcriptionnelle du promoteur de *PR-10a* est inversement corrélée à la liaison de SEBF in vitro. Ceci suggère que SEBF est le facteur responsable de la répression de *PR-10a* via le SE.

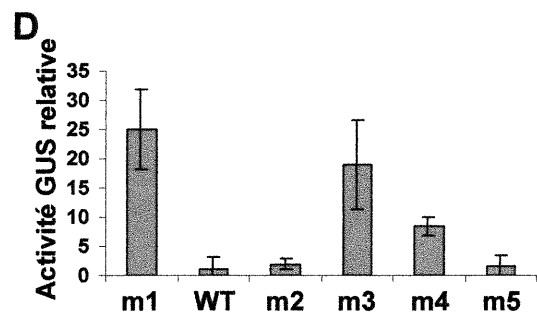
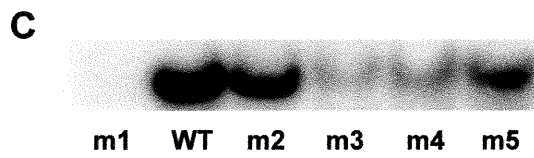
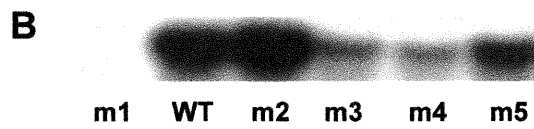
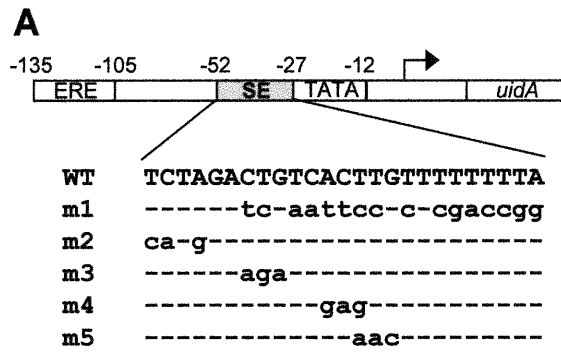
Figure 6. Analyse par mutagenèse du SE.

(A) Représentation schématique des constructions avec le gène rapporteur et les oligonucléotides utilisés dans cette étude. La région de -135 à +136 du promoteur de *PR-10a* a été fusionnée au gène *uidA* bactérien qui code pour la β -glucuronidase. Les positions du ERE, du SE et la boîte TATA sont illustrées. L'origine de la transcription est indiquée par une flèche. La séquence commune entre la séquence sauvage (WT) et les oligonucléotides mutants est indiquée par un tiret et les nucléotides mutants sont indiqués par des lettres minuscules.

(B) Étude de la liaison de SEBF aux oligonucléotides mutants. Retardement sur gel effectué avec 10 μ g d'extrait nucléaire total et 20 000 CPM d'oligonucléotides représentés en (A) marqués au 32 P.

(C) Étude de la liaison de SEBF aux oligonucléotides mutants. Retardement sur gel effectué avec 10 ng de SEBF recombinant mature purifié et 20 000 CPM d'oligonucléotides représentés en (A) marqués au 32 P.

(D) Étude du SE in vivo par mutagenèse du promoteur. La séquence du promoteur de *PR-10a* entre -52 et -27 a été remplacée par les séquences représentées en (A). Les plasmides ainsi générés ont été électroporés dans des protoplastes de feuilles et l'activité β -glucuronidase (GUS) a été mesurée. Les histogrammes représentent le rapport de l'activité des mutants sur l'activité sauvage (WT=1). Les valeurs ont été corrigées pour l'efficacité de transfection par la co-électroporation d'un plasmide exprimant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Les résultats représentent la moyenne d'un minimum de 6 électroporations différentes. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type à la moyenne.



La séquence PyTGTCNC définit le site de liaison de SEBF

Les résultats présentés à la figure 6 montrent que le site de liaison de SEBF se situe à l'intérieur de la séquence GACTGTCAC. Pour mieux définir ce site de liaison, d'autres oligonucléotides mutants ont été synthétisés et leur liaison par SEBF étudiée par retardement sur gel. Comme on peut le voir à la figure 7, les mutations dans la séquence CTGTCAC ont réduit la capacité de SEBF à lier l'ADN (mutants m8, m9, m11, m13, m14, m15, m16, m17 et m19) alors que les mutations à l'extérieur de cette région n'ont pas réduit la liaison (m6, m7, m12 et m20). La mutation du seul A dans cette séquence n'a pas affecté la liaison de SEBF (mutants m10 et m18). En fait, tous les nucléotides peuvent remplacer le A sans modifier la liaison (résultats non présentés). De même, la substitution du premier C par un A (m13) ou un G amène une réduction de la liaison de SEBF tandis que la substitution par un T n'a aucun effet (résultats non présentés). Par conséquent, le site consensus pour la liaison de SEBF est PyTGTCNC.

Une augmentation de la liaison de SEBF a été remarquée avec les mutants m6 et m10 (Figure 7). Il est connu que les facteurs de transcription peuvent former des ponts hydrogènes secondaires, soit avec des nucléotides ou avec l'ossature des phosphates, à l'extérieur de leur site de liaison spécifique, ce qui modifie souvent leur affinité de liaison (Pabo et Sauer, 1992). Par conséquent, les mutants m6 et m10 pourraient favoriser ces contacts secondaires, amenant ainsi une augmentation de liaison de SEBF.

L'analyse des bases de données a révélé la présence du site de liaison de SEBF dans le promoteur de plusieurs gènes induits lors de la réponse de défense (Tableau III). Le site de liaison de SEBF a aussi été retrouvé dans plusieurs gènes induits lors de stress ou lors de la blessure. Ceci suggère un rôle important et général pour SEBF dans la réponse de défense. De plus, le site de liaison de SEBF (PyTGTCNC) est similaire à l'élément de réponse aux auxines (AuxRE, TGTCNC).

Figure 7. Détermination du site de liaison de SEBF.

(A) Analyse du site de liaison par mutations deux par deux.

(B) Analyse du site de liaison par mutations simples.

La séquence des oligonucléotides utilisés pour la détermination du site de liaison de SEBF est indiquée au haut de chaque panneau. La séquence commune entre la séquence sauvage (WT) et les oligonucléotides mutants est indiquée par un tiret et les nucléotides mutants sont indiqués par des lettres minuscules. Les complexes SEBF/ADN provenant d'un retardement sur gel utilisant 10 µg d'extrait nucléaire total et 20 000 CPM d'oligonucléotides mutants marqués au ^{32}P sont montrés.

A

WT	TCTAGACTGTCAC	TTGTTTTT
m6	--gc	-----
m7	----tc	-----
m8	-----ag	-----
m9	-----ac	-----
m10	-----tt	-----
m11	-----ag	-----
m12	-----gt	-----



WT m6 m7 m8 m9 m10 m11 m12

B

WT	TCTAGACTGTCAC	TTGTTTTT
m13	-----a	-----
m14	-----g	-----
m15	-----a	-----
m16	-----a	-----
m17	-----g	-----
m18	-----g	-----
m19	-----a	-----
m20	-----g	-----



WT m13 m14 m15 m16 m17 m18 m19 m20

Tableau III. Le site de liaison de SEBF est présent dans des gènes de défense.

Gène	Organisme	# accession	Séquence
<i>PR-10a</i>	Pomme de terre	M29041	CTGTCAC
<i>PR-10b</i>	Pomme de terre	M29042	CTGTCAC
<i>PR-10 (ypr10b)</i>	Bouleau	AJ289770	CTGTCTC
<i>PR-10 (ypr10a)</i>	Bouleau	AJ289771	CTGTCAC
<i>PR-10</i>	Pomme	AF020542	CTGTCAC
<i>PR-10</i>	Persil	U48862	TTGTCTC
<i>PR-10</i>	Pavot	L06467	CTGTCAC
			CTGTCGC
			CTGTCCC
<i>PR-10</i>	Pêche	AF239177	CTGTCAC
			TTGTCTC
Chitinase	Pomme de terre	AF153195	TTGTCTC
Chitinase	Herbe des bermudes	AF105426	TTGTCTC
Chitinase	Arabidopsis	Y14590	TTGTCTC
Glucanase	Riz	X58877	CTGTCAC
Glucanase	Tomate	AF077340	CTGTCAC
<i>PR-1</i>	Tabac	X66942	TTGTCTC
			CTGTCAC
<i>PR-1</i>	Avoine	Z48728	TTGTCTC
<i>PR-5</i>	Tabac	S68111	TTGTCTC
<i>PR-5</i>	Tabac	D76437	GTGTCTC
Peroxydase	Blé	X85230	CTGTCAC
Oxidase alternative	Lis' voodoo	Z15117	CTGTCAC
Protéine antifongique	<i>Gastrodia elata</i>	AF334813	CTGTCTC
Production d'éthylène (AuxRE)			
ACC synthase	Tomate	AF043122	GTGTCTC
ACC synthase	Tomate	U18057	TTGTCCC
ACC synthase	Tomate	U18056	TTGTCTC
ACC synthase	Fève	AB018355	CTGTCAC
ACC synthase (<i>St-ACS 2</i>)	Pomme de terre	Z27235	TTGTCTC
ACC synthase (<i>St-ACS 1A</i>)	Pomme de terre	Z27233	2x TTGTCCC
			TTGTCTC
			GTGTCTC
ACC synthase	Lupin blanc	AF119410	TTGTCTC
			GTGTCCC
ACC synthase	Petunia	U64804	CTGTCGC
ACC synthase	<i>Musa acuminata</i>	AJ223186	CTGTCCC
ACC synthase	Courge	U37774	CTGTCTC
ACC oxidase	Tomate	Y00478	TTGTCCC
ACC oxidase	Fève	AF315316	CTGTCAC
ACC oxidase	Banane	AF030411	TTGTCTC

La quantité de SEBF qui peut lier le SE varie peu dans des conditions où *PR-10a* est induit.

Les résultats précédents indiquent qu'il existe une corrélation inverse entre la liaison de SEBF au SE, telle que mesurée in vitro, et l'activité du promoteur de *PR-10a* in vivo. Il est donc possible que, dans les plantes, *PR-10a* soit en partie régulé par la modulation de l'activité de liaison de SEBF au SE. Nous avons donc vérifié si l'activité de liaison de SEBF au SE était modifiée lors de l'activation de *PR-10a*. Pour ce faire, des extraits nucléaires ont été préparés à partir de tubercules blessés ou traités avec un éliciteur de la réponse de défense chez la pomme de terre, l'acide arachidonique. Le gène *PR-10a* est induit de manière transitoire suite à la blessure et de manière soutenue après l'application d'acide arachidonique (Figure 8A; Matton et Brisson., 1989). Comme on peut le voir à la figure 8, la quantité de SEBF qui se lie au SE varie peu lors de la blessure ou de l'application de l'éliciteur. Il y a une légère diminution de la liaison de SEBF, après que les tubercules aient été blessés pour revenir par la suite au niveau présent dans les tubercules frais. L'application de l'éliciteur ne semble pas modifier autrement la capacité de SEBF à lier le SE. Ces résultats suggèrent que l'induction de *PR-10a* lors de la blessure pourrait être causée par la diminution de la quantité de SEBF capable de lier le SE, puisque l'induction de *PR-10a* est faible dans ces conditions. Cependant la forte induction du gène suite au traitement avec l'éliciteur pourrait difficilement s'expliquer uniquement par la faible diminution de la quantité de SEBF capable de lier le SE.

Purification de SEBF

L'isolement d'un ADNc pour SEBF pourrait permettre une meilleure caractérisation de ce facteur et de sa fonction pendant la réponse de défense. Pour y arriver, nous avons purifié SEBF à partir de noyaux de tubercules de

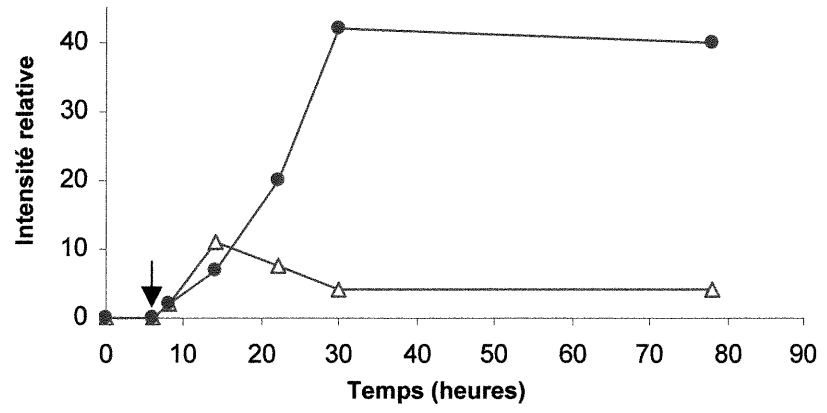
Figure 8. Étude de la liaison de SEBF dans des conditions qui induisent *PR-10a*.

(A) Expression de *PR-10a*; adaptée de Matton et Brisson (1989).

Intensité relative des ARNm de *PR-10a* lors de la blessure (triangles) ou lors du traitement avec l'acide arachidonique (points). Le traitement à l'éliciteur a été effectué 6 heures après avoir infligé la blessure (indiqué par une flèche).

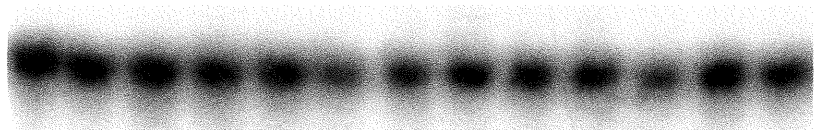
(B) Retardement sur gel utilisant 10 μg d'extrait nucléaire provenant de tubercules frais (TF), blessés (B) ou traités à l'éliciteur (E) et 20 000 CPM du brin codant du SE marqué au ^{32}P . Les protéines nucléaires ont été extraites toutes les 3 heures. L'application de l'éliciteur a été effectuée 6 heures après avoir infligé la blessure

A



B

Temps (h)	3		6		9		12		15		18		21	
Traitement	TF	B	B	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	



pomme de terre en utilisant une étape de purification par chromatographie échangeur d'anions suivie de deux purifications par affinité pour le SE. Le tableau IV montre qu'un facteur de purification de 20 700 a été obtenu lors de la purification de SEBF. L'analyse des différentes fractions par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie a révélé la présence de deux bandes de 29 et 28 kD dans la fraction la plus purifiée (Figure 9, ligne 4). Pour déterminer laquelle de ces deux bandes possède l'activité de liaison à l'ADN, les protéines de l'affinité 2 ont été transférées sur membrane de nitrocellulose et sondées avec le brin codant du SE. Les résultats indiquent que les deux bandes peuvent interagir avec le SE (Figure 9, ligne 5). La séquence amino-terminale des deux protéines a été analysée.

Clonage de SEBF

Une séquence de 50 acides aminés a été obtenue suite à l'analyse de l'extrémité N-terminale de la protéine de 29 kD. L'analyse de l'extrémité N-terminale de la protéine de 28 kD a révélé plusieurs acides aminés à chaque cycle mais une claire similarité de séquence avec la protéine de 29 kD a été observée, ce qui suggère que la protéine de 28 kD contient des formes dégradées de la protéine de 29 kD (résultats non présentés). En utilisant la séquence en acides aminés obtenue lors de l'analyse amino-terminale de la protéine de 29 kD, une stratégie pour obtenir un ADNc par PCR a été élaborée (voir section 2.7). La séquence en acides aminés de SEBF est présentée à la figure 10. Les 50 acides aminés identifiés lors de l'analyse N-terminale de SEBF (indiqués par des étoiles) sont précédés de 59 acides aminés, ce qui suggère que SEBF est synthétisé sous la forme d'un précurseur (preSEBF). Le programme TargetP, qui prédit la localisation intracellulaire des protéines (Emmanuelson et al., 2000), a prédit que SEBF serait localisé dans les chloroplastes avec un niveau de confiance 1 (Tableau V). La localisation des protéines possédant un niveau de confiance 1 est correctement prédite dans

Tableau IV. Purification de SEBF à partir de noyaux de tubercules de pomme de terre.

Fraction	Protéines totales (mg)	Activité totale ^a (pg ADN)	Activité spécifique (pg ADN/ mg)	Purification (facteur)	Rendement (%)
Noyaux	112	$3,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$	1	100
Q-Seph ^b	1,15	$3,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	90	91
Aff.1 ^c	$4,0 \times 10^{-3d}$	$2,3 \times 10^6$	$5,8 \times 10^8$	20 000	70
Aff.2 ^e	$3,5 \times 10^{-3d}$	$2,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^8$	20 700	64

^a Activité totale déterminée en mesurant la quantité de sonde radioactive liée par SEBF en retardement sur gel et en calculant la quantité totale de pg d'ADN que cela représente pour chaque fraction.

^b Q-Seph., Q-Sepharose Fast-Flow anion exchange chromatography

^c Aff.1, Première ronde de purification par affinité

^d Quantité évaluée à partir de gels colorés

^e Aff.2, Deuxième ronde de purification par affinité

Figure 9. Purification de SEBF.

Coloration au bleu de Coomassie de chacune des fractions obtenues lors de la purification de SEBF (lignes 1 à 4). La fraction nucléaire (noyaux, ligne 1) a été chargée sur une colonne Q-Sepharose. L'élution de SEBF de la colonne Q-Sepharose (Q-Seph., ligne 2) a été suivie de deux rondes de purification par affinité (Aff. 1 et Aff. 2, lignes 3 et 4). La ligne 5 montre le résultat d'une hybridation de type Southwestern (SW) effectuée avec les protéines de la deuxième affinité et le brin codant du SE comme sonde radioactive. Les flèches pointent vers les deux protéines purifiées. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués à gauche.

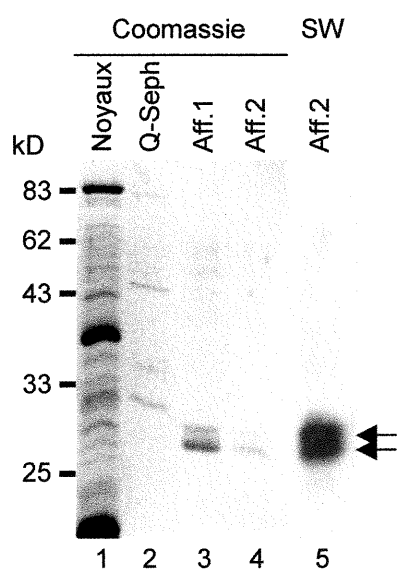


Figure 10. Séquence de SEBF et alignement avec une famille de protéines chloroplastiques liant l'ARN qui sont codées par le noyau.

La séquence en acides aminés de SEBF est présentée. Un membre de chaque groupe de la famille de protéines chloroplastiques liant l'ARN a été choisi pour la comparaison de séquences (cp29A du groupe I, numéro d'accèsion GenBank Q08935; cp31 du groupe II, numéro d'accèsion GenBank P19683; cp33 du groupe III, numéro d'accèsion GenBank P19684). Les acides aminés obtenus lors de l'analyse N-terminale de la protéine purifiée sont indiqués par des étoiles. Le début de la protéine mature est indiqué par une flèche au dessus de la séquence. La séquence transit (T), la région acide (A) et les domaines de liaison à l'ARN (RI et RII) sont soulignés. Les acides aminés qui définissent les cs-RBD sont indiqués par des triangles sous la séquence. Les boîtes noires indiquent l'identité de séquence tandis que les boîtes grises indiquent une substitution conservatrice.

```

SEBF 1 -----MASSSSLHELSTLPOTLP--KPTSOITSSFFSLPPSSLNLSLSSSSFRNDRSSRFVRK-----▲*
cp29A 1 -----MASSSSLHELSTLPOTLPLEKPTSOITSSFFSLPPSSLNLSLSSSS---CFSSRFVRK-----V
cp31 1 ---MSCAKPIIKESMAANSCLSLFLFATWTKSKSPAYPLISNKKPKL--LHLSCHYSPCILSPKTKTSVALQEEENTLILDGQGFSGDLNFEP
cp33 1 MSGCFEFAATASTSSLSLFLFQKPKFSVDHLSLSTYNHENEKNSKIKAHFPISL---KSSSIPTSTC-----ASVSDCV
T
*****
SEBF 61 TLLSDFDQIEEVEAGDDDEEGCSSEGCASYEERNANFDLKI FVGNLPFVSVD SAALAELEFERAGVENVVEVIYDKLTGRSRGFGFVMSKGA VEAACQOF
cp29A 60 TLLSDFDQIEEVEAGDDGYEE-----ERNFSPDLKIFVGNLPFVSAD SAALAELEFERAGVENVVEVIYDKLTGRSRGFGFVMSKGA VEAACQOF
cp31 98 GEGTEEGEVEAVGDAGEDEEFADEEEEFQEPPEEKIFVGNLPFDVDSEGLARLEFEAGVLEAEVIYDQDQSRGFGFVMSKGA VEAACQOF
cp33 79 EIVQEDDEEVALSAEHEE-----IDKKEERVESESVGGRAVGNLPFSYTSQISEPFAEAGVAVVEIYDQDQSRGFGFVMSKGA VEAACQOF
A RI ARI
SEBF 161 NGYEDDGRALRVNSGPAPPKRENSFGDSSVOGCRGGGSDSSNRVYVGNLAWSDQQLLETLFSQGGKVVDAKVVYDRDSGRSRGFGFVYSSAKEVND
cp29A 149 NGYEDDGRALRVNSGPPPEKREN-----SFRGGRGGSDSSNRVYVGNLAWSDQQLLETLFSQGGKVVDAKVVYDRDSGRSRGFGFVYSSAKEVND
cp31 198 NRYDANGRLLTVNKAARGERE-----RPPRFCSQRYVGNLAWSDQQLLETLFSQGGKVVDAKVVYDRDSGRSRGFGFVYSSAKEVND
cp33 176 DQSOVCGRIWVAVNFFVEVREGERE---MSAKIRSTYQEVFVDSPHVAVNLSMAVTSQCLRDAFAPGPFMSAKVYDRDSGRSRGFGFVYSSAKEVND
▲▲RI RII ARI
SEBF 261 ALESLDGVDLGGRAIRVSPAEPARRQF
cp29A 245 ALESLDGVDLGGRAIRVSPAEPARRQF
cp31 287 AIANLDGSLDGRIRVVAEORSRNTF
cp33 273 AADLNNEVELEGREIRVAVAGCAPVSPVSPVETSPENDSDNSELLSLS
▲▲RI

```

Tableau V. Prédications TargetP de la localisation cellulaire de SEBF.

Précurseur (acc.#) ^a	cTP ^c	Scores TargetP			TargetP Localisation prédite	NC ^b
		mTP ^d	SP ^e	Autre		
SEBF (AF389431)	0,987	0,015	0,010	0,010	Chloroplaste	1
Petite sous-unité de Rubisco (X69759)	0,874	0,044	0,096	0,099	Chloroplaste	2
Protéine a/b liant la chlorophylle (CAA78379)	0,846	0,031	0,177	0,154	Chloroplaste	2

^a Numéro d'accèsion GenBank

^b Le niveau de confiance est la différence (diff) entre le score le plus haut et le deuxième plus haut. Les niveaux sont définis comme suit NC1: diff >0,8; NC2: 0,8>diff>0,6; NC3: 0,6>diff>0,4; NC4: 0,4> diff>0,2; NC5: 0,2> diff.

^c Score pour peptide transit du chloroplaste

^d Score pour peptide transit de la mitochondrie

^e Score pour peptide signal

99% des cas sur un échantillonnage non-redondant de protéines de plantes (Emmanuelson et al., 2000). A titre de comparaison les prédictions pour la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxydase (Rubisco) et la protéine a/b liant la chlorophylle sont présentées. TargetP a aussi prédit que l'extension N-terminale de SEBF serait clivée après l'acide aminé 58. Ceci suggère que les 59 acides aminés présents dans preSEBF (absents dans la protéine isolée des noyaux) font partie d'une séquence transit pour la localisation aux chloroplastes. Les séquences transits sont des extensions amino-terminales riches en acides aminés hydrophiles requises pour le ciblage aux chloroplastes. Elles sont clivées, suite à l'importation, par des peptidases spécifiques pour générer les protéines matures. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant les programmes de prédictions Predotar (<http://www.inra.fr/Internet/Produits/Predotar/>) et iPSORT (<http://www.hypothesiscreator.net/iPSORT/>).

Une région acide localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine mature précède deux domaines de liaison à l'ARN à séquence consensus (cs-RBD, identifiés RI et RII à la figure 10). Ces domaines, aussi connus comme motif de reconnaissance de l'ARN (RRM), séquence consensus de ribonucléoprotéine (RNP-cs) et motif RNP (Burd et Dreyfuss, 1994), sont séparés par une région riche en glycine. Une recherche dans les bases de données a révélé un haut degré de similarité de séquence avec des protéines chloroplastiques liant l'ARN encodées par le noyau (Figure 10). Le degré de similarité le plus élevé est pour la protéine cp29A de tabac (86% d'identité de séquence) qui fait partie du groupe 1 des protéines liant l'ARN des chloroplastes (Ohta et al., 1995).

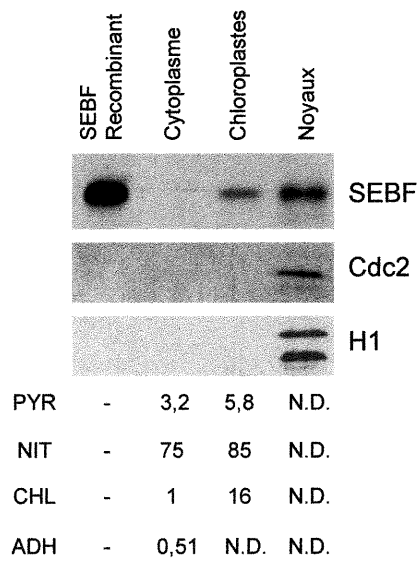
Pour confirmer que la protéine codée par l'ADNc correspond bien à SEBF, la forme mature de SEBF a été exprimée chez *Escherichia coli* sous la forme d'une fusion GST, puis purifiée et testée pour la liaison au SE. La figure 6C montre que la protéine recombinante se lie au SE avec une spécificité de liaison similaire à la protéine isolée de la plante (Figure 6B).

Distribution cellulaire de SEBF

La purification de SEBF à partir de noyaux indique que la protéine est nucléaire. Cependant, la présence d'une séquence transit potentielle dans preSEBF suggère que la protéine pourrait également se retrouver dans les plastides. Ceci nous a poussé à examiner plus en détail la localisation cellulaire de SEBF. Des anticorps anti-SEBF ont été produits et des fractions cellulaires de feuilles de plants de pomme de terre ont été préparées. L'intégrité de chacune des fractions a été vérifiée immunologiquement et par des essais enzymatiques. La figure 11 montre que l'activité alcool déshydrogénase est limitée au cytoplasme. Les noyaux ne contenaient aucune trace de chlorophylle tandis que le cytoplasme montrait une légère contamination avec cette molécule. Aucune activité des marqueurs chloroplastiques pyrophosphatase alcaline ou nitrite réductase (MacDonald et apRees, 1983; Smith et al., 1993) n'a été retrouvée dans la fraction nucléaire. La fraction chloroplastique était exempte de contamination nucléaire tel que démontré par l'absence des protéines nucléaires histone H1 et Cdc2 (Figure 11). L'analyse de ces fractions à l'aide de l'anticorps anti-SEBF a révélé qu'une protéine immunologiquement semblable à SEBF était présente dans le noyau et les chloroplastes (Figure 11). Une seule bande de 29 kD est présente dans les deux compartiments cellulaires et comigre avec la forme recombinante mature de SEBF (qui ne possède pas la séquence transit; Figure 11, SEBF). Aucune protéine de poids moléculaire supérieur à SEBF n'a été détectée dans l'une ou l'autre des fractions ce qui suggère que si SEBF est synthétisé sous forme de précurseur, celui-ci est mûré efficacement par des peptidases avant son importation au noyau.

Figure 11. Localisation cellulaire de SEBF.

Des feuilles de pomme de terre ont été fractionnées en cytoplasme, chloroplastes et noyaux. Dix μg de protéines de chacune des fractions ont été séparés par un gel SDS-PAGE de 12%. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose et la présence de SEBF ainsi que les protéines nucléaires histone H1 et Cdc2 ont été révélées par des anticorps spécifiques. La première ligne (SEBF recombinant) a été chargée avec la protéine qui a servi à l'immunisation des lapins. La chlorophylle (CHL), la nitrite réductase (NIT) et la pyrophosphatase alcaline (PYR) ont été utilisées comme marqueurs chloroplastiques (les valeurs sont présentées en μg chlorophylle $\cdot\text{mg}$ protéine $^{-1}$, nmol nitrite $\cdot\text{mg}$ protéine $^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ et μmol $\text{PO}_4\cdot\text{mg}$ protéine $^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivement) et l'alcool déshydrogénase (ADH) a été utilisée comme marqueur cytoplasmique (les valeurs sont présentées en augmentation de DO $\cdot\text{mg}$ protéine $^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). N.D., non détectable; -, non déterminée.



Un seul gène code pour SEBF

Pour exclure que les protéines retrouvées dans le noyau et le cytoplasme soient le produit de deux gènes, l'ADN génomique de pomme de terre a été digéré et utilisé pour faire une analyse de type Southern. Comme illustré à la figure 12A, l'hybridation de l'ADN génomique avec un fragment de l'ADNc de SEBF a révélé la présence d'un seul fragment EcoRI et deux fragments HindIII. Ces résultats étaient prévisibles pour un gène unique car la sonde utilisée dans cette expérience possédait un site HindIII et aucun site EcoRI. La présence de deux fragments XbaI est attribuable à la présence d'un site XbaI dans le troisième intron du gène (résultats non présentés). L'analyse de l'ADN génomique par PCR (Figure 12B) a révélé la présence de trois introns dans le gène codant pour SEBF. Ces trois introns sont positionnés au même endroit que dans les gènes homologues de tabac et d'Arabidopsis (Ye et al., 1991; Ohta et al., 1995). Ces résultats indiquent qu'il y a un seul gène codant pour SEBF dans le génome de pomme de terre. De plus, l'absence d'intron du côté 5' du gène (Figure 12C) indique que l'absence d'une séquence transit dans la protéine nucléaire n'est pas due à de l'épissage alternatif. Ceci a été confirmé par des expériences d'amplification rapide des extrémités d'ADNc (5'RACE) qui ont toutes montrées des extrémités 5' identiques à SEBF (résultats non présentés). Ces résultats sont supportés par la conservation de l'organisation génomique des gènes homologues à SEBF chez le tabac et Arabidopsis. L'ensemble de ces résultats indique que la forme nucléaire de SEBF est codée par ce gène.

SEBF peut réprimer la transcription

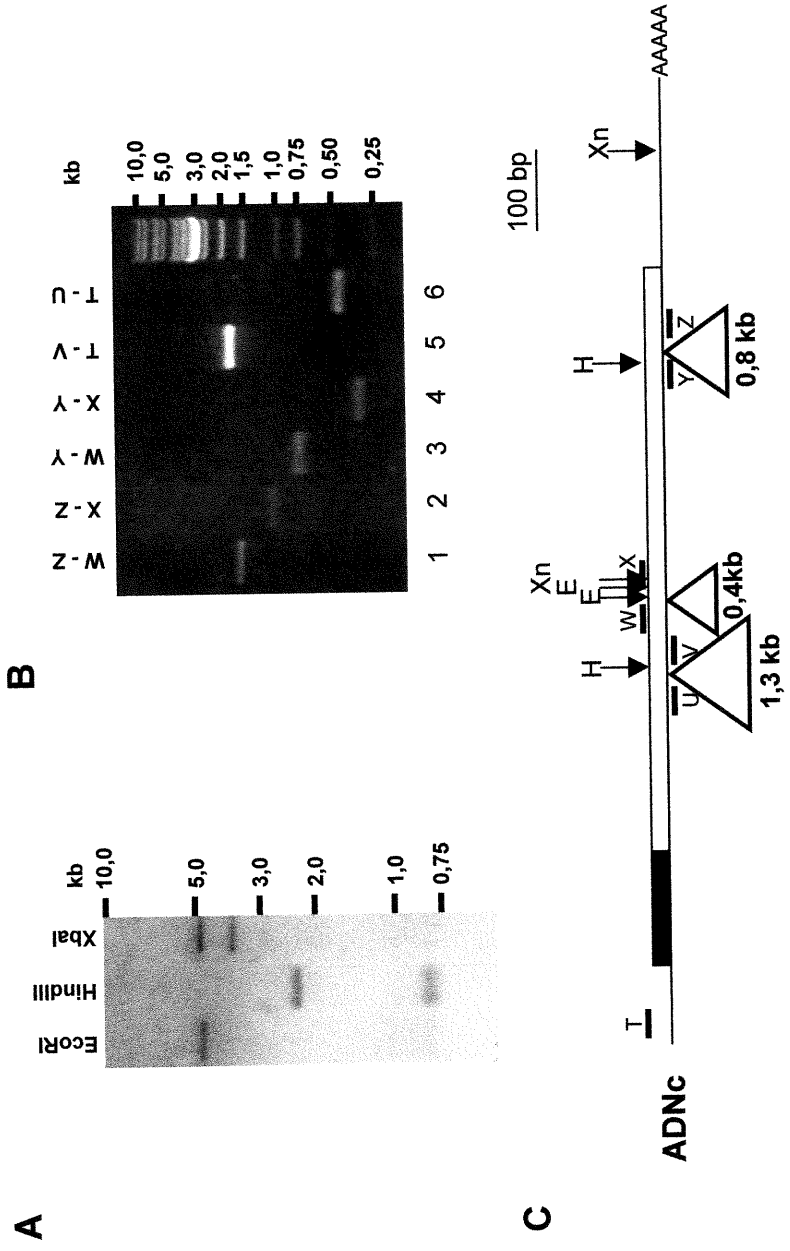
La corrélation entre la liaison de SEBF à des oligonucléotides mutants et la capacité de ces derniers à agir comme éléments de régulation négative dans les protoplastes suggèrent que SEBF est le facteur responsable de la répression de

Figure 12. Organisation génomique de SEBF.

(A) Analyse de SEBF par hybridation de type Southern. Cinq μg d'ADN génomique ont été chargés par puits et hybridés avec un fragment XmnI de l'ADNc de SEBF illustré en (C). Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués à droite.

(B) Analyse par PCR de l'ADN génomique. Les positions des oligonucléotides (T à Z) sur l'ADNc sont indiquées en (C). La différence de taille entre les produits d'amplification des puits 5 et 6, 3 et 4 et 2 et 4 définit la taille des introns 1, 2 et 3 respectivement. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués à droite.

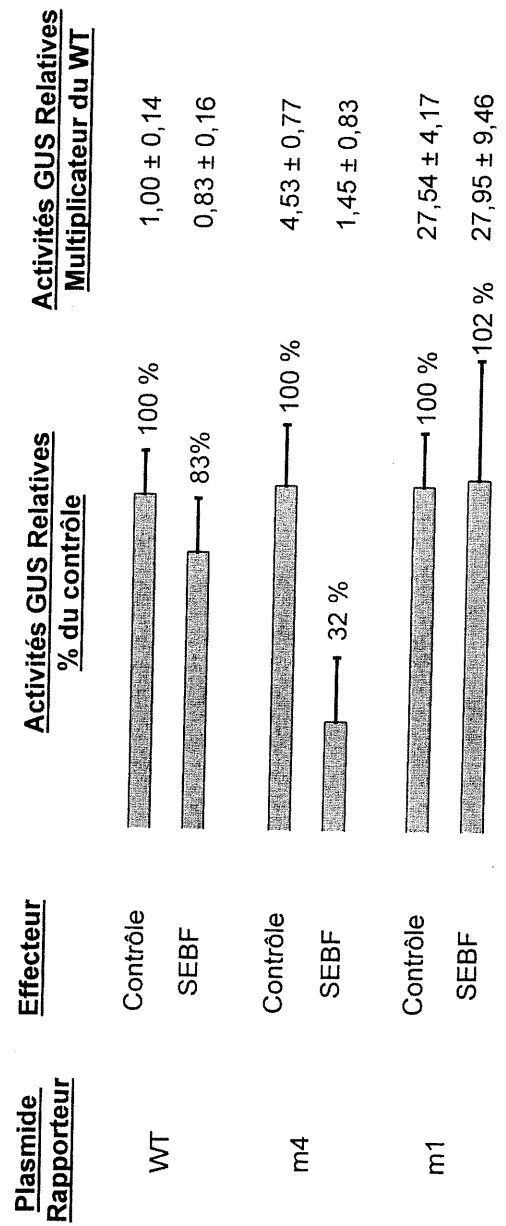
(C) Organisation génomique de SEBF. L'ADNc est représenté par une ligne et la région codante par une boîte. La séquence transit N-terminale est représentée en noir et les introns sont représentés par des triangles sortant de l'ADNc. Les oligonucléotides utilisés dans l'analyse par PCR sont indiqués par des lettres (T, U, V, W, X, Y et Z). Les positions et tailles des introns sont déduites de l'analyse par PCR (B). Les sites de restriction sont indiqués par des flèches: HindIII (H), EcoRI (E) et XmnI (X).



PR-10a par le SE. Pour vérifier la capacité de SEBF à réprimer la transcription, un plasmide surexprimant preSEBF sous le contrôle du promoteur 35S a été construit et coélectroporé dans des protoplastes avec diverses constructions possédant le gène rapporteur de la β -glucuronidase sous le contrôle de différentes formes du promoteur de *PR-10a* mutées dans le SE (Figure 6A). Même si une répression a été observée avec le promoteur sauvage, l'activité β -glucuronidase était trop faible et les résultats n'étaient pas statistiquement significatifs (Figure 13, WT). Ceci était attendu car cette construction est déjà réprimée en protoplastes. Pour contourner ce problème, preSEBF a été exprimé avec le promoteur partiellement dérprimé m4 (Figure 6D), qui est lié avec moins d'affinité que le brin sauvage par les protéines SEBF natives et recombinantes (Figures 6B et 6C). Nous nous attendions à ce que la surexpression de SEBF compense pour la plus faible affinité de liaison pour ce mutant. La figure 13 démontre, en effet, une diminution de 68 % de l'activité transcriptionnelle quand preSEBF est surexprimé, par comparaison avec la surexpression d'une protéine contrôle (Figure 13, m4). La répression n'a pas été observée lorsque preSEBF a été surexprimé avec le mutant m1 (Figure 13, m1) auquel il ne se lie pas, ce qui confirme que la répression requiert un élément cis lié par SEBF et que les résultats observés ne sont pas dus à la titration d'un activateur ou un blocage transcriptionnel causé par la surexpression d'une protéine. Ces résultats démontrent que SEBF participe à la répression SE-dépendante du gène *PR-10a* et que l'expression de preSEBF résulte en une activité localisée au noyau.

Figure 13. La surexpression de SEBF réprime la transcription.

Les séquences codantes pour preSEBF et une protéine contrôle ont été insérées dans le vecteur d'expression pBI223D (effecteurs). Ces plasmides ont été coélectroporés dans des protoplastes de feuilles de pomme de terre avec les plasmides rapporteurs décrits à la figure 6D (plasmides rapporteurs). Les histogrammes représentent l'effet de la surexpression de SEBF par rapport à la surexpression d'une protéine contrôle (contrôle = 100). La colonne de droite (multiplicateur de WT, WT=1) est incluse pour faciliter la référence à la figure 6D. Les valeurs sont corrigées pour l'efficacité de transfection en mesurant l'activité luciférase résultant de la coélectroporation du plasmide pWB216. Les résultats représentent un minimum de trois électroporations individuelles. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type à la moyenne. GUS, β -glucuronidase.



4 Discussion

Les résultats présentés dans cette thèse ont tout d'abord mis en évidence la ressemblance entre les PR-10 et les MLP. Nous nous sommes par la suite concentrés sur la régulation du gène *PR-10a* de la pomme de terre. Nous avons identifié un facteur, SEBF, qui peut lier l'ADN simple brin du promoteur de ce gène. Nous avons aussi démontré qu'il existait une forte corrélation inverse entre la liaison de SEBF et l'activité du promoteur de *PR-10a*. La purification de SEBF suivi du clonage de son ADNc a permis d'identifier des domaines de liaison à l'ARN similaires à ceux présents dans les hnRNP de mammifères. La protéine recombinante montre une spécificité de liaison similaire à la protéine native. Des expériences de fractionnement cellulaire ont permis d'identifier des protéines immunologiquement reliées et de tailles similaires dans le noyau et les chloroplastes, ce qui suggère que SEBF est présent dans les deux compartiments cellulaires. Finalement, la surexpression de SEBF dans un système d'expression transitoire a confirmé sa participation dans le contrôle de l'expression de *PR-10a*.

PR-10 dans le latex

Le latex est un liquide blanchâtre qui suinte des plantes blessées (voir Figure 14). Le latex est produit par des cellules spécialisées qu'on appelle laticifères (Mahlberg, 1993). Le latex est en fait le cytoplasme de ces cellules spécialisées et peut être séparé en deux fractions par centrifugation : le cytosol qui contient 92% des protéines et 11% des alcaloïdes et les vésicules qui contiennent 89% des alcaloïdes et 8% des protéines (Nessler et al., 1985). Les alcaloïdes du latex de laitron peuvent neutraliser pendant plusieurs heures les insectes herbivores qui en ont ingéré (Dussourd et Hoyle, 2000). D'autres

études ont également révélé la présence de protéines PR dans le latex (Chye et Cheung, 1995; Yagami et al., 1998) qui semble donc jouer un rôle protecteur chez les plantes. Compte tenu de leur contenu riche en protéines de défense et leur capacité à synthétiser de grandes quantités d'alcaloïdes, il est probable que les laticifères jouent un rôle important dans les réactions de défense. Une étude des MLP du pavot montre que les PR-10 sont spécifiquement exprimées dans les laticifères (Nessler et al., 1985) qui sont généralement situées

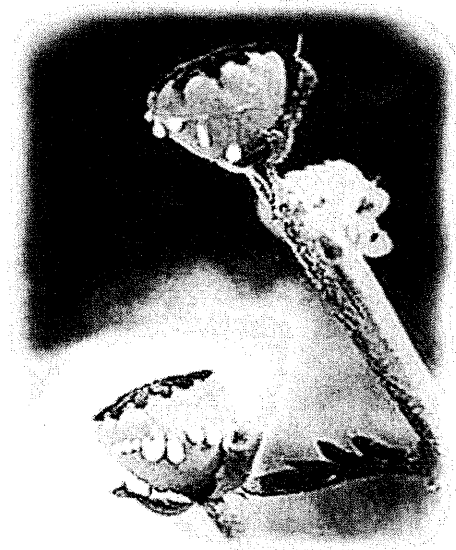


Figure 14. Le latex qui suinte du pavot est une source de PR-10.

dans le système vasculaire de la plante (Mahlberg, 1993; Nessler et al., 1995). Il existe donc un rapprochement intéressant avec le gène *PR-10a* qui, chez la pomme de terre, est aussi induit dans les tissus vasculaires suite à une blessure (Constabel et Brisson, 1995). Cette similarité d'expression suggère la conservation de cellules spécialisées en défense dans le système vasculaire des plantes.

Les protéines liant l'ADN simple brin et la régulation de l'expression génique par les hnRNP

Des études antérieures ont démontré qu'un autre élément du promoteur de *PR-10a* est aussi reconnu par une protéine liant l'ADN simple brin (Desveaux et al., 2000). Cet élément, le ERE, est localisé en amont du SE entre -135 et -105 et est reconnu par le facteur liant l'ADN simple brin PBF-2 (Després et al., 1995; Desveaux et al., 2000). Des expériences ont démontré que PBF-2 peut activer la transcription d'une fusion *PR-10a-uidA* en protoplastes à partir du ERE

(Desveaux et Brisson, résultats non publiés). À la lumière de ces résultats, il semble que les facteurs nucléaires liant l'ADN simple brin jouent un rôle important dans la régulation de *PR-10a*. Une situation similaire a été décrite pour plusieurs gènes d'animaux (Rothman-Denes et al., 1998). Par exemple, on retrouve plusieurs éléments d'ADN simple brin dans le promoteur du proto-oncogène *c-myc* qui sont liés par des facteurs différents (Michelotti et al., 1996b). Il y a tout d'abord l'élément FUSE («far upstream sequence element») qui est reconnu spécifiquement par FBP («FUSE binding protein»). FBP, tout comme SEBF, reconnaît spécifiquement un seul brin de l'élément auquel il se lie (Duncan et al., 1994). De plus, FBP se lie à FUSE par des motifs KH qui servent pour la liaison à l'ARN (Siomi et al., 1994). Ensuite, il y a l'élément CT qui permet à hnRNP K d'interagir avec TBP («TATA binding protein») pour activer la transcription de *c-myc* (Michelotti et al., 1996a). Sur le brin opposé vient se lier la protéine à doigt de zinc CNBP pour participer avec hnRNP K à la co-régulation de *c-myc* à partir de l'élément CT (Michelotti et al., 1995). Finalement, les protéines MSSP-1 et MSSP-2, qui contiennent des cs-RBD similaires à ceux retrouvés dans SEBF, peuvent lier l'élément simple brin myc(H-P)21 (Negishi et al., 1994; Takai et al., 1994).

Il peut paraître inhabituel que des facteurs liant l'ADN simple brin puissent réguler la transcription. En effet, la forme simple brin n'est pas une conformation énergiquement favorisée par rapport à la forme à double hélice torsadée de l'ADN. Cependant, la séparation des brins est directement liée au degré de surenroulement négatif de l'ADN. Le niveau de surenroulement est contrôlé par l'activité des topoisomérases, par les protéines qui causent des torsions dans l'ADN et par le niveau de transcription qui génère du surenroulement négatif en amont d'un gène activement transcrit (Wang et Lynch, 1993). Ainsi, la séparation des brins d'ADN est souvent engendrée par le mouvement de l'ARN polymérase qui cause un stress torsionnel sur l'ADN résultant en un surenroulement négatif en amont du gène transcrit (Giaver et Wang, 1988). Cet effet peut affecter les gènes avoisinants car le surenroulement négatif peut être perçu à plus de 4 kb d'un gène transcrit (Wang

et Dröge, 1997). Le surenroulement négatif ainsi généré provoque la formation et la stabilisation de structures tige-boucles, cruciformes et triplex d'ADN qui possèdent toutes des régions d'ADN simple brin permettant ainsi aux facteurs liant l'ADN simple brin d'avoir accès à leur site (Rothman-Denes, 1998). Un surenroulement négatif localisé peut aussi être généré par la liaison d'une HMG non-spécifique qui génère un arc dans l'ADN (Grasser, 1998). D'un autre côté, il est connu que le répresseur de la transcription YB-1 possède une activité intrinsèque de séparation des brins lui permettant de lier sa cible (MacDonald et al., 1995). De même, la protéine FBP (voir ci-haut) possède une forte activité ADN hélicase (Vindigni et al., 2001). Tous ces phénomènes pourraient être envisagés pour permettre la liaison de SEBF au SE.

Les hnRNPs sont probablement les protéines liant l'ADN simple brin les mieux caractérisées qui participent à la régulation de la transcription. Par exemple, la protéine hnRNP D et ses homologues peuvent activer (Tay et al., 1992; Lau et al., 2000; Tolnay et al., 2000) ou réprimer (Kamada et Miwa, 1992; Smidt et al., 1995; Chen et al., 1998) la transcription d'une variété de promoteurs. Une autre hnRNP qui contient des cs-RBD, hnRNP A1, réprime la transcription du gène de la thymidine kinase (Lau et al., 2000). Il n'est donc pas surprenant qu'une protéine comme SEBF qui possède des cs-RBD puisse aussi agir comme répresseur de la transcription. D'autres protéines végétales qui contiennent des cs-RBD, comme FMV-3b d'Arabidopsis, CEBP-1 de l'œillet et ACBF de tabac, sont capables de lier spécifiquement des éléments de régulation et représentent par le fait même des régulateurs potentiels de la transcription (Didier et Klee, 1992; Maxson et Woodson, 1996; Séguin et al., 1997).

La présence de domaines de liaison à l'ARN dans SEBF et les multiples fonctions associées aux cs-RBD suggèrent que SEBF puisse jouer un rôle dans la maturation des ARN. Les homologues chloroplastiques de tabac de SEBF peuvent lier les ARNm et les pré-ARNm contenant des introns (Nakamura et al., 1999). Ils ont aussi été associés à la stabilisation des ARNm et à la protection

contre les ribonucléases dans les chloroplastes (Nakamura et al., 2001). De plus, l'édition des ARNm dans les chloroplastes requiert, tout comme pour l'édition nucléaire, la présence de hnRNP (Lau et al., 1997; Hirose et Sigiura, 2001). Il serait intéressant de savoir si la forme nucléaire de SEBF peut elle aussi lier l'ARN et déterminer, le cas échéant, quelle implication cela pourrait avoir dans la réponse de défense.

Localisation cellulaire de SEBF

La présence d'une protéine de poids moléculaire semblable et immunologiquement reliée à SEBF dans les chloroplastes suggère que SEBF est efficacement ciblé à ce compartiment cellulaire. Cela est supporté par la présence d'une séquence transit sur la protéine codée par l'ADNc et par des études chez d'autres espèces qui ont démontré la présence des homologues de SEBF dans les chloroplastes (Ye et al., 1991; Mieszcza et al., 1992; Ohta et al., 1995). Nos résultats démontrent que le gène codant pour SEBF est unique et que l'absence de séquence transit dans la protéine purifiée ne peut être due à un événement d'épissage alternatif. Ceci suggère que les protéines nucléaires et chloroplastiques sont dérivées d'un même précurseur. De plus la protéine nucléaire ne possède pas la séquence transit ce qui indiquerait l'existence d'un mécanisme de clivage extrachloroplastique des séquences transits. Au moins deux autres cas de clivage extrachloroplastique de séquence transit ont été rapportés. Chez la pomme de terre, la phosphorylase de l'amidon est synthétisée sous forme d'un précurseur et ciblée vers les amyloplastes dans de jeunes tubercules, mais s'accumule dans le cytoplasme dans des tubercules plus âgés (Brisson et al., 1989). Puis, chez la tomate, seule une faible proportion de l'aminopeptidase à leucine (LAP1) se rend dans les chloroplastes, la majeure partie du précurseur étant maturé dans le cytoplasme (Gu et al., 1996). L'analyse de la séquence de SEBF (R-F-V-R-K) en amont de son site de maturation révèle la présence d'un site potentiel de clivage par les protéases de

type subtilisine (K/R-X₁₋₃-K/R-K/R). Des sites similaires sont aussi retrouvés à proximité du site de maturation de la phosphorylase de l'amidon (R-R-P-K-R) et de LAP1 (K-R-S-K-R). Chez la tomate, une espèce très proche de la pomme de terre, il existe au moins 15 gènes différents codant pour des subtilisines parmi lesquels quelques membres sont induits lors de la réponse de défense (Jorda et al., 1999; Meichtry et al., 1999). Cependant, la totalité des protéases de type subtilisines végétales isolées jusqu'à maintenant possèdent un peptide signal et sont ciblées vers la matrice extracellulaire (Tornero et al., 1996; Meichtry et al., 1999). Il serait donc intéressant d'identifier la protéase responsable du clivage extrachloroplastique de SEBF et d'établir sa spécificité de clivage pour identifier d'autres substrats potentiels.

Dahlin et Cline (1991) ont démontré que la capacité des plastides à importer des protéines est régulée avec le développement, les plastides perdant graduellement leur capacité d'importation avec la maturation des tissus. Cette capacité d'importation peut être contrôlée par la phosphorylation des séquences transits qui réduit la vitesse d'importation des précurseurs. (Waegemann et Soll, 1996). Il serait intéressant de vérifier dans des expériences ultérieures si la localisation de SEBF change avec le développement. Néanmoins, la double localisation cellulaire de SEBF en fait un bon candidat pour réguler les changements métaboliques observés lors de la réponse de défense dans le noyau et les chloroplastes. En effet, il est bien établi qu'en plus de l'activation des gènes de défense dans le noyau, l'infection induit des changements dans le métabolisme primaire se déroulant dans les chloroplastes, incluant une réduction de la photosynthèse et de la synthèse de Rubisco (Kombrink et Hahlbrock, 1990; Somssich et Hahlbrock, 1998). SEBF pourrait donc jouer un rôle important dans la coordination des changements induits lors de la réponse de défense dans les deux compartiments cellulaires.

Le site de liaison de SEBF est présent dans d'autres gènes de défense et est similaire à l'élément de réponse aux auxines (AuxRE).

L'analyse des bases de données a révélé la présence du site de liaison de SEBF dans le promoteur de plusieurs gènes induits lors de la réponse de défense (Tableau III). Le site de liaison de SEBF a aussi été retrouvé dans plusieurs gènes induits lors de stress ou lors de la blessure. Ceci suggère un rôle important et général pour SEBF dans la réponse de défense. Il serait intéressant dans le futur de démontrer la liaison de SEBF à d'autres promoteurs et de savoir comment SEBF participe à la régulation de ces gènes de défense. Il demeure aussi intéressant de savoir si les homologues de SEBF dans les autres espèces participent aussi au contrôle de la réponse de défense.

La comparaison du site de liaison de SEBF (PyTGTCNC) avec d'autres éléments de régulation a révélé une forte similarité avec les AuxRE (TGTCTC) présents dans les AuxRE composés. Les AuxRE composés sont formés de deux éléments séparables : un élément d'expression constitutif et un élément de réponse aux auxines. En absence d'auxines, ce dernier réprime l'action de l'élément d'activation constitutif. La présence d'auxine relève la répression et permet ainsi l'action de l'élément constitutif (Ulmasov et al., 1995). Cependant, l'élément de réponse aux auxines semble occupé, indépendamment de la présence d'auxine, par un facteur qui, jusqu'à maintenant, n'a pas été identifié mais qui peut interagir avec les facteurs de réponse aux auxines (ARF; Ulmasov et al., 1999). Des études ont démontré que les auxines peuvent réguler plusieurs gènes de défense (Grosset et al., 1990; Jouanneau et al., 1991). Récemment, Mayda et al. (2000) ont isolé un mutant d'*Arabidopsis* qui montrait une insensibilité aux auxines ainsi qu'une sensibilité accrue aux pathogènes, ce qui démontre une interaction complexe entre les voies menant à ces phénotypes. Ces résultats ainsi que la forte ressemblance du site de liaison de SEBF avec les AuxRE indiquent que SEBF pourrait aussi être impliqué dans le contrôle hormonal de l'expression génique. SEBF est présent dans les noyaux des tissus frais, il pourrait donc occuper l'élément de réponse aux auxines et

ainsi réprimer l'action de l'élément constitutif. Quelques mécanismes pour relever cette répression sont envisageables : il peut y avoir compétition entre SEBF et un activateur spécifique pour la liaison aux AuxRE ou encore la liaison d'un co-activateur au répresseur lié à l'AuxRE.

Régulation de *PR-10a* par SEBF.

La purification de SEBF à partir de tubercules frais (Tableau IV), sa capacité à lier l'ADN (Figure 5) et sa capacité à réprimer la transcription (Figure 13) suggèrent que *PR-10a* est réprimé par SEBF dans les tubercules frais. Les résultats présentés à la figure 8 montrent qu'il y a une légère diminution de la quantité de SEBF capable de lier le SE dans les noyaux de tubercules blessés. La blessure induit de manière transitoire le gène *PR-10a* (Figure 8A; Matton et Brisson, 1989), ce qui correspond à la diminution transitoire de la liaison de SEBF qui est observée à la figure 8B. Ceci suggère que la dérégulation de *PR-10a* lors de la blessure peut être causée en partie par le départ de SEBF du SE. La diminution de la liaison de SEBF survient à peu près au même moment que l'augmentation de la liaison de PBF-2 au ERE (Després et al., 1995), ce qui indique une coordination entre l'action de l'activateur PBF-2 et celle du répresseur SEBF pour un contrôle optimal de la transcription de *PR-10a* dans les tubercules blessés.

Le haut niveau d'expression de *PR-10a* observé suite au traitement avec un éliciteur ne peut être expliqué par l'activité de liaison à l'ADN de SEBF. De plus, ce haut niveau d'expression ne peut probablement pas être expliqué entièrement par la liaison de PBF-2 au ERE pour deux raisons. Premièrement, la présence du ERE n'est pas suffisante pour contrer l'effet du SE lors de l'étude de délétions du promoteur de *PR-10a* en plants transgéniques, et deuxièmement, le niveau maximal de PBF-2 capable de lier le ERE atteint lors du traitement avec l'éliciteur, bien que maintenu sur une plus longue période de temps, ne dépasse guère le niveau maximal atteint lors de la blessure

(Després et al., 1995). Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme pour contrer l'action répressive de SEBF qui est lié au SE. Les études de Després et al. (1995) laissent entrevoir une solution à ce mécanisme. En effet, ces études démontrent la présence d'un élément de contrôle positif (ECP) situé entre -155 et -135, tout juste en amont du ERE, qui rétablit le haut niveau d'expression de *PR-10a*. En fait, le niveau d'expression atteint avec cette construction est semblable au niveau d'expression obtenu lors de la délétion du SE. Ces expériences suggèrent qu'il pourrait y avoir une interaction entre le ou les facteurs qui lient le ECP et SEBF. Des études de délétion effectuées chez les levures ont révélé la présence d'un domaine d'activation de la transcription à l'extrémité N-terminale de SEBF. Ce domaine n'est révélé que suite à la délétion d'une partie de l'extrémité C-terminale de SEBF (Dulude et Brisson, résultats non-publiés). L'extrémité N-terminale de SEBF est particulièrement acide avec une charge nette de -14 sur les 40 premiers acides aminés. Les domaines acides, comme le domaine de transactivation acide de VP16, sont des domaines qui activent fortement la transcription chez les plantes (McCarthy et al., 1991; Feldbrügge et al., 1994). Une interaction entre SEBF et un facteur liant le ECP pourrait provoquer un changement de conformation de SEBF et ainsi révéler le domaine d'activation acide de SEBF. Un des mécanismes de contrôle de l'activité des facteurs de transcription propose un changement de conformation causé par la phosphorylation qui permet au domaine d'activation d'interagir avec la machinerie d'initiation de la transcription (Gonzalez et al., 1991; Hunter et Karin, 1992). On sait qu'une protéine kinase C est impliquée dans l'induction du gène *PR-10a* (Subramaniam et al., 1997) et une étude préliminaire démontre que SEBF peut être phosphorylé par cette kinase (Boyle, Subramaniam et Brisson, résultats non-publiés). La présence d'un domaine d'activation de la transcription caché dans SEBF et la phosphorylation de SEBF par une PKC sont des pistes intéressantes pour le contrôle de l'activité de SEBF et mériteront une attention particulière dans le futur.

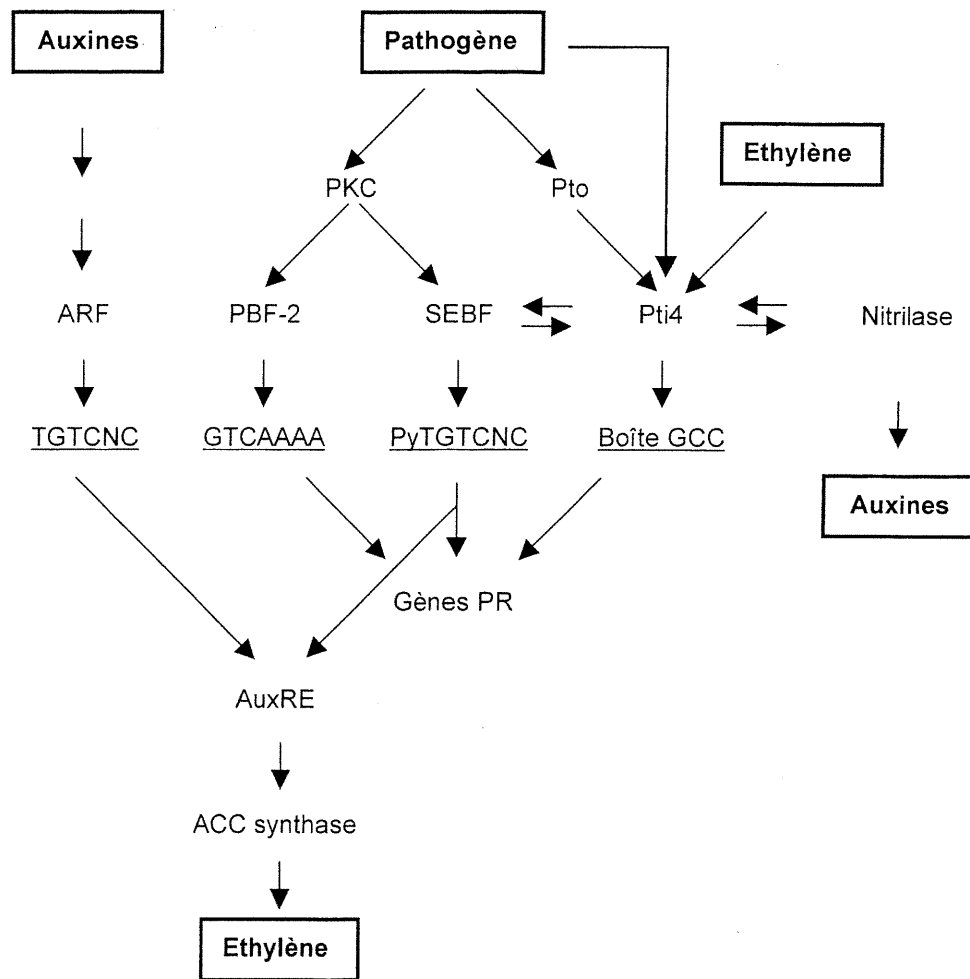
Hypothèses et modèle de travail

La figure 15 illustre notre présent modèle de travail. Nos résultats démontrent que SEBF peut lier le SE et réguler l'expression du gène de défense *PR-10a*. De plus, le site de liaison de SEBF (PyTGTCNC) est retrouvé dans le promoteur de plusieurs gènes de défense (Tableau III) ce qui suggère un rôle important pour SEBF dans le contrôle de l'expression des gènes *PR*. Chez la pomme de terre l'induction du gène *PR-10a* est aussi sous le contrôle du facteur de transcription PBF-2 dont le site de liaison se retrouve aussi dans plusieurs gènes de défense (Desveaux et al., 2000; Desveaux et al., résultats non-publiés). Une protéine kinase C est impliquée dans l'induction de la réponse de défense chez la pomme de terre (Subramaniam et al., 1997). Cette PKC ne phosphoryle pas directement PBF-2 mais elle est impliquée dans l'augmentation de l'activité de la liaison à l'ADN de PBF-2. Des résultats préliminaires suggèrent que cette PKC phosphoryle directement SEBF peut-être pour en contrôler l'activité. Chez la tomate, la reconnaissance du pathogène *Pseudomonas syringae* par la protéine de résistance Pto induit la transcription des gènes *PR* par la phosphorylation du facteur de transcription de la famille des EREBP Pti4 qui reconnaît spécifiquement les boîtes GCC (Gu et al., 2000). La reconnaissance des pathogènes stimule aussi la transcription du gène *Pti4* indépendamment de Pto ce qui résulte en une augmentation de la quantité de Pti4 disponible pour activer la transcription des gènes de défense (Thara et al., 1999; Gu et al., 2000).

Une forte similarité de séquence a été observée entre le site de liaison de SEBF (PyTGTCNC) et l'élément de réponse aux auxines (AuxRE, TGTCNC). Cela suggère que SEBF peut reconnaître une partie des AuxRE tel que démontré au tableau III par la présence du site de liaison de SEBF dans le promoteur de plusieurs gènes codant pour l'ACC synthase. L'ACC synthase contrôle l'étape limitante dans la synthèse de l'éthylène. On sait que l'éthylène est une hormone de défense qui induit les gènes de défense par le contrôle de l'expression des facteurs de transcription de la famille des EREBP dont Pti4 fait

Figure 15. Modèle de travail

La perception des pathogènes contrôle la transcription des gènes de défense par différentes voies de signalisation. Par leurs activités respectives de liaison à l'ADN, Pti4 et SEBF contrôlent la transcription de plusieurs gènes de défense. SEBF en liant le promoteur de l'ACC synthase peut contrôler la synthèse d'éthylène et Pti4 par son interaction avec la nitrilase peut contrôler la synthèse des auxines. La synthèse de ces hormones peut ensuite contrôler d'autres gènes pour une amplification du signal de défense. Notre modèle de travail propose un rôle important pour l'interaction entre SEBF et Pti4 dans la coordination des réponses de défense et hormonale. ARF: facteurs de réponse aux auxines, AuxRE : élément de réponse aux auxines



partie (Fujimoto et al., 2000). Une étude de double hybrides en utilisant SEBF comme proie a révélé une interaction entre SEBF et Pti4 (Roy et Brisson, résultats non publiés). Des expériences sont présentement en cours pour établir la fonction biologique de cette interaction. Néanmoins, cette interaction permet d'établir une boucle de contrôle tant positive que négative sur l'induction des gènes *PR*. De plus, Pti4 avait déjà été impliqué dans la rétroaction du contrôle hormonal par l'interaction avec une nitrilase qui contrôle une étape importante dans la synthèse des auxines (Xu et al., 1998). Les auxines, par l'action des facteurs de réponse aux auxines (ARF) contrôlent la synthèse de l'éthylène en contrôlant la transcription de l'ACC synthase. L'interaction entre Pti4 et SEBF pourrait donc jouer un rôle important dans la coordination entre les réponses hormonales et la réponse de défense.

Conclusions et perspectives

Les connaissances actuelles des facteurs qui contrôlent la transcription de *PR-10a* ne permettent pas d'établir un modèle qui correspond à l'expression réelle de *PR-10a* lors du traitement à l'éliciteur. L'identification du facteur contrôlant l'élément de contrôle positif, situé entre -155 et -135, permettrait sûrement de remplir plusieurs trous dans nos hypothèses de travail. De plus, l'élucidation du mécanisme qui permet de contourner l'effet de répression de SEBF est probablement une étape importante dans la compréhension des mécanismes qui contrôlent l'expression de *PR-10a*. Dans cette ligne de pensée, la phosphorylation de SEBF et la présence d'un domaine d'activation acide sont des pistes intéressantes qui doivent être suivies. Il demeure aussi important d'élucider le mécanisme par lequel SEBF lie l'ADN simple brin et par quels mécanismes l'ADN simple brin est généré dans les promoteurs des gènes de défense. Il serait aussi intéressant d'isoler la protéine responsable de la maturation extrachloroplastique de SEBF qui peut contrôler la quantité de SEBF

dans le noyau, d'autant plus que PBF-2 est lui aussi synthétisé sous forme d'un précurseur.

SEBF possède des domaines de liaison à l'ARN. Il serait donc intéressant de vérifier la capacité de SEBF à lier des ARN dans le noyau et de vérifier quels mécanismes post-transcriptionnels peuvent être influencés par SEBF. SEBF participe-t-il à un couplage entre les mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels ? SEBF ne se retrouve pas dans le cytoplasme, peut-il séquestrer des ARNm dans le noyau et ainsi bloquer l'expression d'un gène ?

Les rôles de l'interaction entre Pti4 et SEBF doivent être élucidés. Il faut s'interroger sur l'effet transcriptionnel de cette interaction sur des gènes qui possèdent les éléments auxquels peuvent se fixer SEBF et Pti4 et quels seront les effets de cette interaction sur l'expression des gènes qui en possèdent un seul. Il faut aussi comprendre la biochimie de cette interaction. Cette interaction se transporte-t-elle jusqu'à l'ADN, ou ne fait-elle que séquestrer les deux facteurs, les empêchant ainsi d'atteindre leur cible ? Quel est l'effet réel de cette interaction sur le contrôle des gènes de défense en relation avec le contrôle hormonal ?

Des plants transgéniques de pommes de terre surexprimant SEBF, preSEBF et un antisens sont présentement en préparation. Ces plants seront très utiles pour vérifier certaines hypothèses. Le gène *PR-10a* est-il réprimé dans ces plants ? La réponse de défense est-elle altérée ? Ces plants transgéniques permettront aussi d'analyser quels gènes ont un niveau d'expression altéré par l'analyse de puces génétiques («gene chip microarrays»). Une telle puce contenant 1000 gènes a été développée pour la pomme de terre et d'autres sont en développement. Un knock-out d'*Arabidopsis* contenant un transposon inséré dans le troisième exon de l'homologue de SEBF cp29 a aussi été obtenu et servira à vérifier la fonction de cet homologue dans la réponse de défense chez cette plante. De plus, *Arabidopsis* est la plante modèle qui est la plus utilisée pour des études génétiques. Un grand nombre de

mutants bien caractérisés existent et permettent de localiser la fonction d'une protéine dans une voie de signalisation particulière par croisement. Plus encore, les puces génétiques d'Arabidopsis possèdent une plus grande diversité de gènes.

Des études de double-hybrides sont présentement en cours pour identifier des partenaires à SEBF. Tel que mentionné plus haut, des résultats préliminaires ont identifié Pti4, un facteur de transcription impliqué lui aussi dans le contrôle de la réponse de défense. L'identification de partenaires pour SEBF permettra d'élucider les rôles de SEBF ainsi que son mode de fonctionnement dans la cellule et dans la réponse de défense.

5 Références

Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Reuveni, M., Zhu, J.K., Niu, X., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci.* **118**: 11-23.

Agriculture et Agroalimentaire Canada. 1998/1999 Canadian potato crop situation and trends. (<http://www.agr.ca/>)

Agrios, G.N. (1988). *Plant pathology*. Academic Press inc., San Diego.

Allen, M.D., Yamaski, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M., Suzuki, M. (1998). A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.* **17**: 5485-5496.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402.

Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784.

Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., Van Loon, L.C. (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* **47** : 79-87.

Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15.

- Austin, R.J., Biggin, M.D. (1995). A domain of the *even-skipped* protein represses transcription by preventing TFIIID binding to a promoter : repression by cooperative blocking. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 4683-4693.
- Ausubel, F.M., Brent R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley. New York.
- Baeuerle, P.A., Baltimore, D. (1988). I κ B : a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* **242** :540-546.
- Bantignies, B., Séguin, J., Muzac, I., Dedaldechamp, F., Gulick, P., Ibrahim, R. (2000). Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol. Biol.* **42**: 871-881.
- Barnes, W.M. (1990). Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9183-9187.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B.J. (1994). *RPS2* of *Arabidopsis thaliana* - a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* **265**: 1856-1860.
- Bolwell, G.P., Davies D.R., Gerrish, C., Auh, C.K., Murphy, T.M. (1998). Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* **116**: 1379-1385.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid, defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., Lamb, C. (1994). Function of the oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712.

- Brisson, N., Giroux, H., Zollinger, M., Camirand, A., Simard, C. (1989). Maturation and subcellular compartmentation of potato starch phosphorylase. *Plant Cell* **1**: 559-566.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G, Cammue, B.P.A, Osborn, R.W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108**: 1353-1358.
- Bruce, R.J., West, C.A. (1982). Elicitation of casbene synthetase in castor bean. The role of peptic fragments of the cell wall in elicitation by a fungal endopolygalacturonase. *Plant Physiol.* **69**: 1181-1188.
- Burd, C.G., Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621.
- Büttner, M., Singh, K.B. (1997). *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5961-5966.
- Calkhoven, C.F., Ab, G. (1996). Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem. J.* **317**: 329-342.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systematic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592.
- Carlson, M. (1997). Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 1-23.
- Chen, H., Hu, M.U., Gacad, M.A., Adams, J.S. (1998). Cloning of a novel dominant-negative-acting estrogen response element-binding protein in the heterogenous nuclear ribonucleoprotein family. *J. Biol. Chem.* **273**: 31352-31357.

Chen, W.Q., Singh, K.B. (1999). The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis *GST6* promoter is mediated in part by an *ocs* element. *Plant J.* **19**: 667-677.

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

Chye, M.L., Cheung, K.Y. (1995). Beta-1,3-glucanase is highly expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.* **29**: 397-402.

Constabel, C.P., Brisson, N. (1992). The defense-related gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. *Planta* **188**: 289-295.

Constabel, C.P., Brisson, N. (1995). Stigma-and vascular-specific expression of the *PR-10a* gene of potato: a novel pattern of expression of a pathogenesis-related gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 104-113.

Dahlin, C., Cline, K. (1991). Developmental regulation of the plastid protein import apparatus. *Plant Cell* **3**: 1131-1140.

da Costa, E., Silva, O., Klein, L., Schmelzer, E., Trezzini, G.F., Hahlbrock, K. (1993). BPF-1, a pathogen-induced DNA-binding protein involved in the plant defense response. *Plant J.* **4**: 125-135.

Dahlin, C., Cline, K. (1991). Developmental regulation of the plastid protein import apparatus. *Plant Cell* **3**: 1131-1140.

Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.

Davis, K.R., Lyon, G.D., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1984). Host-pathogen interactions XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia caratovora* elicits

phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* **74**: 52-60.

Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene expression. *Plant Physiol.* **100**: 561-567.

Delaney, T., Friedrich, L., Ryals, J. (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6602-6606.

Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.

de Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J., Kijne, J. (1996). Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from Arabidopsis. *Nucl. Acids Res.* **24**: 4624-4631.

Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., Fobert, P.R. (2000). The Arabidopsis NPR1/MIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**: 279-290.

Després, C., Subramaniam, R., Matton, D.P., Brisson, N. (1995). The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* **7**: 589-598.

Desveaux, D., Després, C., Joyeux, A., Subramaniam, R., Brisson, N. (2000). PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in *PR-10a* gene activation in potato. *Plant Cell* **12**: 1477-1490.

Didier, D.K., Klee, H.J. (1992). Identification of an Arabidopsis DNA-binding protein with homology to nucleolin. *Plant Mol. Biol.* **18**: 977-979.

Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.

Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 479-501.

Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097.

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

Dubos, C., Plombion, C. (2001). Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* ait.) seedlings. *J. Exp. Bot.* **52**: 1143-1144.

Duncan, R., Bazar, L., Michelotti, G., Tomonoga, T., Krutzsch, H., Avigan, M., Levens, D. (1994). A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of *c-myc* and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* **8**: 465-480.

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

Dussourd, D.E., Hoyle, A.M. (2000). Poisoned plusiines: toxicity of milkweed latex and cardenolides to some generalist caterpillars. *Chemoecol.* **10**: 11-16.

Dyson, T. (1999). World food trends and prospects to 2025. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5929-2936.

Ekramoddoullah, A.K.M., Yu, X.S., Sturrock, R., Zamani, A., Taylor, D. (2000). Detection and seasonal expression pattern of a pathogenesis-related protein (PR-10) in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) tissues. *Physiol. Plant.* **110**: 240-247.

Emmanuelson, O., Nielsen, H., von Heijne, M. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**: 1005-1016.

Eulgem, T., Rushton, P.,J., Robatzek, S., Somssich, I.,E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**:199-206.

Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* **18** : 4689-4699.

Faktor, O., Kooter, J.M., Loake, G.J., Dixon, R.A. Lamb, C.J. (1997). Differential utilisation of regulatory cis-elements for stress-induced and tissue-specific activity of a french-bean chalcone synthase promoter. *Plant Sci.* **124**: 175-182.

FAO (2001). The state of food and agriculture 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. (Aussi disponible sur le web au site <http://www.fao.org/>).

Farmer, E.E. (2001). Surface-to-air signals. *Nature* **411**: 854-856.

Feldbrügge, M., Sprenger, M., Dikelbach, M., Yazaki, K., Harter, K., Weisshaar, B. (1994). Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell* **6**: 1607-1621.

Feldbrügge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, Weisshaar, B. (1997). *PcMYB1*, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light regulatory promoter unit. *Plant J.* **11**:1079-1093.

Fritensky, B., Horowitz, D. , Hadwiger, L.A. (1988). cDNA sequences for pea disease resistance response genes. *Plant Mol. Biol.* **11**: 713-715.

Frye, C. A., Tang, D.Z., Innes, R.W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 373-378.

- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**: 393-404.
- Fukada, Y., Shinshi, H. (1994). Characterization of a novel cis-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol. Biol.* **24**: 485-493.
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J.N., van Neerven, R.J.J., Schou, C., Lowenstein, H., Spangfort, M.D. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Struct. Biol.* **3**: 1040-1045.
- Gegenheimer, P. (1990). Preparation of extracts from plants. *Methods Enzymol.* **182**: 174-193.
- Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B. (1990). Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 327-333.
- Giaver, G.N., Wang, J.C. (1988). Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* **55** : 849-856.
- Gilchrist, D.G. (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Ann. Rev. Phytopathol.* **36**: 393-414.
- Gonzalez, G.A., Menzel, P., Leonard, J., Fisher, W., Montminy, M.R. (1991). Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1306-1312.
- Grasser, K.D. (1998). HMG1 and HU proteins: Architectural elements in plant chromatin. *Trends Plant Sci.* **3**: 260-265.

Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., Ausubel, F.M. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**: 551-563.

Gross, P., ap Rees, T. (1986). Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta* **167**: 140-145.

Grosset, J., Meyer, Y., Chartier, Y., Kauffmann, S., Legrand, M., Fritig, B. (1990). Tobacco mesophyll protoplasts synthesize 1,3- β -glucanase, chitinases, and "osmotins" during *in vitro* culture. *Plant Physiol.* **92**: 520-527.

Gu, Y.Q., Chao, W.S., Walling, L.L. (1996). Localization and post-translational processing of the wound-induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. *J. Biol. Chem.* **271**: 25880-25887.

Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., Martin, G.B. (2000) Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* **12**: 771-785.

Hanna-Rose, W., Hansen, U. (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repression. *Trends Genet.* **12** : 229-234.

Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

Heo, W.D., Lee, S.H., Kim, M.C., Kim, J.C., Chung, W.S., Chun, H.J., Lee, K.J., Park, C.Y., Park, H.C., Choi, J.Y., Cho, M.J. (1999). Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 766-771.

Hirose, T., Sugiura, M. (2001). Involvement of a site specific *trans*-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J.* **20**: 1144-1152.

- Hucklesby, D.P., Dalling, M.J., Hageman, R.H. (1972). Some properties of two forms of nitrite reductase from corn (*Zea mays* L.) scutellum. *Planta* **104**: 220-233.
- Hunter, T., Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375-387.
- IPC (2001). CIP potato facts: production use, consumption, trade. International Potato Center (<http://www.cipotato.org/>).
- Israel, D.I. (1993). A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucl. Acids Res.* **21**: 2627-2631.
- Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A., Ebner, H., Scheiner, O., Kraft, D. (1989). IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* **44**: 385-395.
- Jones, D.A., , Thomas, C.M., Hammond-Kosac, K.E., Balint-Kurti, P.J., Jones, J.D.G. (1994). Isolation of the *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporidium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**: 789-793.
- Jorda, L., Coego, A., Conejero, V., Vera, P. (1999). A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J. Biol. Chem.* **274**: 2360-2365.
- Jouanneau, J.-P., Lapous, D., Guern, J. (1991). In plant protoplasts, the spontaneous expression of defense reactions and the responsiveness to exogenous elicitors are under auxin control. *Plant Physiol.* **96**: 459-466.
- Jupin, L., Chua, N.H. (1996). Activation of the CaMV as-1 cis-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a. *EMBO J.* **15**: 5679-5689.
- Kajava, A.V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **277**: 519-527.

Kamada, S. and Miwa, T. (1992). A protein binding to CArG box motifs and to single-stranded DNA functions as a transcriptional repressor. *Gene* **119**: 229-236.

Kawaoka, A., Ebinuma, H. (2001). Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM proteins. *Phytochemistry* **57**: 1149-1157.

Keleher, C.A., Goutte, C., Johnson, A.D. (1988). The yeast cell-type-specific repressor $\alpha 2$ acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. *Cell* **53** : 927-936.

Keller, T. Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266.

Kombrink, E., Hahlbrock, K. (1990). Rapid, systemic repression of the synthesis of the ribulose biphosphate carboxylase small-subunit mRNA in fungus-infected or elicitor-treated potato leaves. *Planta* **181**: 216-219.

Kovtum, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2940-2945.

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

Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, P.M., Fang, R.-X., Chua, N.-H. (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7890-7894.

Lam, E., Kato, N., Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response . *Nature* **411**: 848-853.

- Lam, E., Lam, Y.K.P. (1995). Binding site requirements and differential representation of TGA factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucl. Acids Res.* **23**: 3778-3785.
- Lamb, C.J., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant . Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-275.
- Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M., Dixon, R.A. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**: 215-224.
- Large, E.C. (1962). *The advance of the fungi*. Dover publications inc., New York, NY, USA. 488 pages.
- Lau, J.S., Baumeister, P., Kim, E., Roy, B., Hsieh, T.-Y., Lai, M., Lee, A.S. (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter. *J. Cell. Biochem.* **79**: 395-406.
- Lau, P.P., Zhu, H.-J., Nakamuta, M., Chan, L. (1997). Cloning of an apobec-1-binding protein that also interacts with apolipoprotein B mRNA and evidence for its involvement in RNA editing. *J. Biol. Chem.* **272**: 1452-1455.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., Ward, E. (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **16**: 223-233.
- Lee, T.I., Young, R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* **34**: 77-137.
- Ligterink, W., Kroj, T., Zurnieden, U., Hirt, H., Sheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-2057.

Logemann, E., Parniske, M., Hahlbrock, K. (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5905-5909.

Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989). A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation, and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.* **8**: 1641-1648.

Luger, K., Richmond, T.J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8** : 140-146.

Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M., Thornton, J.M. (2000). An overview of the structure of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* **1** : 1-37.

MacDonald, F.D., apRees, T. (1983). Enzymatic properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean. *Biochim. Biophys. Acta* **755**: 81-89.

MacDonald, G.H., Itoh-Lindstrom, Y., Ting, J.P.-Y. (1995). The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J. Biol. Chem.* **270**: 3527-3533.

Mahlberg, P.G. (1993). Lactifers: an historical perspective. *Bot. Rev.* **59**: 1-23.

Magnien, E., Dalschaert, X., Devreux, M. (1980). Different radiosensitivities of *Nicotiana plumbaginifolia* leaves and regenerating protoplasts. *Plant Sci. Lett.* **19**: 231-241.

Marineau, C., Matton, D.P., Brisson, N. (1987). Differential accumulation of potato mRNAs during the hypersensitive response induced by arachidonic acid. *Plant Mol. Biol.* **9**: 335-342.

Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436.

Martinez, C., Montillet, J.L., Bresson, E., Agnel, J.P., Dai, G.H., Daniel, J.F., Geifer, J.P., Nicole, M. (1998). Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv *malvaraceum* race 18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1038-1047.

Matton, D.P., Brisson, N. (1989). Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2**: 325-331.

Matton, D.P., Prescott, G., Bertrand, C., Camirand, A., Brisson, N. (1993). Identification of cis-acting elements involved in the regulation of the pathogenesis-related gene *STH-2* in potato. *Plant Mol. Biol.* **22**: 279-291.

Mauch, F., Mauch-Manie, B., Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissues. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* **88**: 936-942.

Maxson, J.M., Woodson, W.R. (1996). Cloning of a DNA-binding protein that interacts with the ethylene-responsive enhancer element of the carnation *GST1* gene. *Plant Mol. Biol.* **31**: 751-759.

Maxwell, D.P., Maxwell, M.D. (2001). Introduction to plant pathology.
<http://www.plantpath.wisc.edu/pp300/>

Mayda, E., Mauch-Mani, B., Vera, P. (2000). Arabidopsis *dth9* mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. *Plant Cell* **12**: 2119-2128.

McCarthy, D.R., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lasar, M, Vasil, I.K. (1991). The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**: 895-905.

Meichtry, J., Amrhein, N., Schaller, A. (1999). Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol. Biol.* **39**: 749-760.

Menkens, A.E., Schindler, U., Cashmore, A.R. (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 506-510.

Métraux, J.-P., Singer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Rashdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006.

Michelotti, E.F., Michelotti, G.A., Aronsohn, A.I., Levens, D. (1996a). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2350-2360.

Michelotti, E.F., Tomonoga, T., Krutzsch, H., Levens, D. (1995). Cellular nucleic acid binding protein regulates the CT element of the human *c-myc* protooncogene. *J. Biol. Chem.* **270**: 9494-9499.

Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pullner, A., Duncan, R.C., Eick, D., Levens, D. (1996b). Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human *c-myc* gene in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2656-2669.

Mieszczak, M., Klahre, U., Levy, J.H., Goodall, G.J., Filipowicz, W. (1992). Multiple plant RNA binding proteins identified by PCR: Expression of cDNAs encoding RNA binding proteins targeted to chloroplasts in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 390-400.

Moiseyev, G.P., Beintema, J.J., Fedoreyeva, L.I., Yakovlev, G.I. (1994). High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta* **193**: 470-472.

Moiseyev, G.P., Fedoreyeva, L.I., Zhuravlev, Y.N., Yasnetskaya, E., Jekel, P.A., Beintema, J.J. (1997). Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Lett.* **407**: 207-210.

Mölders, W., Buchala, A., Métraux, J.-P. (1996). Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol.* **112**: 787-792.

Moons, A., Prinsen, E., Bauw, G., Vanmontague, M. (1997). Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* **9**: 2243-2259.

Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M., Sugita, M. (1999). Chloroplast ribonucleoprotein are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs. *FEBS Lett.* **460**: 437-441.

Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M., Sugita, M. (2001). Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNAs in the stroma. *J. Biol. Chem.* **276**: 147-152.

Nessler, C.L., Allen, R.D., Galewsky, S. (1985). Identification and characterization of latex-specific proteins in opium poppy. *Plant Physiol.* **79**: 499-504.

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

Nigeshi, Y., Nishita, Y., Saegusa, Y., Kakizaki, I., Galli, I., Kihara, F., Tamai, K., Miyajima, N., Iguchi, Ariga, S.M., Ariga, H. (1994). Identification and cDNA cloning of single-stranded DNA binding proteins that interact with the region upstream of the human *c-myc* gene. *Oncogene* **9**: 133-143.

Ng, H.H., Bird, A. (2000). Histone deacetylases : silencers for hire. Trends Biochem. Sci. **25** : 121-126.

Nürnberg, T., Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. Trends Plant Sci. **6**: 372-379.

Oerke, E.-C., Dehne, H.-W. (1997). Global crop production and the efficacy of crop protection - current situation and future trends. Eur. J. Plant. Pathol. **103**: 203-215.

Ohme-Takagi, M., Shinshi, H. (1995). Ethylène-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell **7**: 173-182.

Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M. (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. Plant Cell **13** : 1959-1968.

Ohta, M., Sugita, M., Sugiura, M. (1995). Three types of nuclear encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31, cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasms. Plant. Mol. Bio. **27**: 529-539.

Owen-Hughes, T., Workman, J.L. (1994). Experimental analysis of chromatin function in transcription control. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. **4** : 403-441.

Paakkonen, E., Seppanen, S., Holopainen, T., Kokko, H., Karenlampi, S., Karenlampi, L., Kangasjarvi, J. (1998). Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in relation to growth, visible injuries, and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. New Phytol. **138**: 295-305.

Pabo, C.O., Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. Annu. Rev. Biochem. **61**: 1053-1095.

- Park, J.M., Park, C.-J., Lee, S.-B., Ham, B.-H., Shin, R., Paek, K.-H. (2001). Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-Type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*. **13**: 1035-1046.
- Parvin, J. et Sharp, P.A. (1993). DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. *Cell* **73** : 533-540.
- Pelletier, J.N., Campbell-Valois, F.-X., Michnick, S.W. (1998). Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12141-12146.
- Peng, M., Kuc, J. (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathol.* **82**: 696-699.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharna, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., Mundy, J. (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120.
- Pinto, M.P., Ricardo, C.P.P. (1995). *Lupinus albus* L pathogenesis-related proteins that show similarity to PR-10 proteins. *Plant Physiol.* **109**: 1345-1351.
- Poupard, P., Brunel, N., Leduc, N., Viemont, J.D., Strullu, D.G., Simoneau, P. (2001). Expression of a Bet v 1 homologue gene encoding a PR-10 protein in birch roots: induction by auxin and localization of the transcripts by in situ hybridization. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 57-63.
- Pozueta-Romero, J., Klein, M., Houlné, G. Schantz, M.-L., Meyer, B., Schantz, R. (1995). Characterization of a family of genes encoding a fruit-specific wound-stimulated protein of bell pepper (*Capsicum annuum*): identification of a new family of transposable elements. *Plant Mol. Biol.* **28**: 1011-1025.

Puhringer, H., Moll, D. Hoffman-Sommergruber, K., Watillon, B., Katinger, H., Machado, M.L.D. (2000). The promoter of an apple *ypr10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci.* **152**: 35-50.

Raventos, D., Jensen, A.B., Rask, M.-B., Casacuberta, J.M., Mundy, J., San Segundo, B. (1995). A 20 bp cis-acting element is both necessary and sufficient to mediate elicitor response of a maize PRms gene. *Plant J.* **7**: 147-156.

Reymond, P., Farmer, E.E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 404-411.

Romeis, T., Piedras, P., Jones, J.D.G. (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* **12**: 803-815.

Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D.G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves. Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**: 273-288.

Rost, B., Sander, C. (1993). Prediction of secondary structure at better than 70-percent accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**: 584-599.

Rost, B., Sander, C. (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* **19**: 55-72.

Rothman-Denes, L.B., Dai, X., Davydova, E., Carter, R., Kazmierczak, K. (1998). Transcriptional regulation by DNA structural transitions and single-stranded DNA-binding proteins. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **LXIII**: 63-73.

Rushton, P.J., MacDonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M., Hooley, R. (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of α -*Amy2* genes. *Plant Mol. Biol.* **29**: 691-702.

Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoter of parsley *PR-1* genes. *EMBO J.* **15**: 5690-5700.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819.

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

Ryerson, D.E., Heath, M.C. (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection. *Plant Cell* **8**: 393-402.

Salmeron, J.M., Barker, S.J., Carland, F.M., Mehta, A.Y., Staskawicz, B.J. (1994). Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition. *Plant Cell* **6**: 511-520.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

Schumann, G.L. (1991). *Plant diseases : their biology and social impact* (2nd edition). The American Phytopathology Society, St-Paul, MN, USA. 397 pages.

Séguin, A., Laible, G., Leyva, A., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1997). Characterization of a gene encoding a DNA-binding protein that interacts *in vitro* with vascular specific *cis* elements of the phenylalanine ammonia-lyase promoter. *Plant Mol. Biol.* **35**: 281-291.

Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 821-861.

- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L., Dreyfuss, G. (1994). Essential rôle for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X chromosome. *Cell* **77**: 33-39.
- Small, S., Kraut, R., Hoey, T., Warrior, R., Levine, M. (1991). Transcriptional regulation of a pair-rule stripe in *Drosophila*. *Genes Dev.* **5** : 827-839.
- Smidt, M.P., Russchen, B., Snippe, L., Wijnholds, J., Ab, G. (1995). Cloning and characterisation of a nuclear, site specific ssDNA binding protein. *Nucl. Acids Res.* **23**: 2389-2395.
- Smith, A.G., Marsh, O., Elder, G.H. (1993). Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphynogen oxidase in higher plants. *Biochem. J.* **292**: 503-508.
- Smith, A.M., ap Rees T. (1979). Pathways of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants. *Planta* **146**: 327-334.
- Smith, C.J. (1996). Accumulation of phytoalexins: defence mechanisms and stimulus response system. *New Phytol.* **132**: 1-45.
- Smith, D.B., Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with the glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
- Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* **3**: 86-90.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollman, J., Hahlbrock, K. (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding 'pathogenesis-related' proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2427-2430.

Steinmetz, A.C.U., Renaud, J.-P., Moras, D. (2001). Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**: 329-359.

Stubenrauch, F., Leigh, I.M., Pfister, H. (1996). E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J. Virol.* **70** : 119-126.

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

Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W., Brisson N. (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* **19**: 769-772.

Susuki, M., Kuroda, C., Oda, E., Tsunoda, S., Nakamura, T., Nakajima, T., Oda, K. (1995). G10BP, an E1A-Inducible negative regulator of Sp1, represses transcription of the rat fibronectin gene. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 5423-5433.

Swoboda, I., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Scheiner, O., Heberle-Bors, E., Vicente, O. (1996). Bet v 1 proteins, the major allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro. *Physiol. Plant.* **96**: 433-438.

Takai, T., Nishita, Y., Iguchi-Arigo, S.M., Arigo, H. (1994). Molecular cloning of MSSP-2, a *c-myc* gene single-strand binding protein : characterization of binding specificity and DNA replication activity. *Nucl. Acids Res.* **22**: 5576-5581.

Tay, N., Chan, S.-H., Ren, E.-C. (1992). Identification of a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like protein that functions as transcriptional activator of the hepatitis B virus enhancer II. *J. Virol.* **66**: 6841-6848.

Thara, V.K., Tang, X.Y., Gu, Y.Q., Martin, G.B., Zhou, J.M. (1999). *Pseudomonas syringae* pv tomato induces the expression of tomato EREBP-like

genes Pti4 and Pti5 independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *Plant J.* **20**: 475-483.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.

Thulke, O., Conrath, U. (1998). Salicylic acid has a dual rôle in the activation of defense-related genes in parsley. *Plant J.* **14**: 35-42.

Tijan, R., Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation : a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77** : 5-8.

Tolnay, M., Barany, L., Tsokos, G.C. (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 contains transactivator and DNA-binding domains. *Biochem. J.* **348**: 151-158.

Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants - Similarity of functional domains to subtilisin-like endoprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6338-2-6337.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**: 645-656.

Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5844-5849.

Ulmasov, T., Liu, Z.-B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **7**: 1611-1623.

Utriainen, M., Kokko, H., Auriola, S., Sarrazin, O., Karemlampi, S. (1998). PR-10 protein is induced by copper stress in roots and leaves of a Cu/Zn tolerant clone of birch, *Betula pendula*. *Plant Cell Environ.* **21**: 821-828.

van Holde, K., Zlatanova, J. (1993). Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *Bioessays* **16** :59-68.

van Loon, L.C., van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology* **40**: 199-211.

van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* **12** : 245-264.

Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* **6**: 959-965.

Vindigni, A, Ochem, A., Triolo, G., Flaschi, A. (2001). Identification of human DNA helicase V with the far upstream element-binding protein. *Nucl. Acids Res.* **29**: 1061-1067.

Vinson, C.R., LaMarco, K.L., Johnson, P.F., Landschulz, W.H., McKnight, S.L. (1988). In situ detection of sequence-specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage. *Genes Dev.* **2**: 801-806.

von Röpenack, E., Parr, A., Schulze-Lefert, P. (1998). Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J. Biol. Chem.* **273**: 9013-9022.

- Waegemann, K., Soll, J. (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 6545-6554.
- Walter, M.H., Liu, J.W., Wunn, J., Hess, D. (1996). Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*ypr10*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur. J. Biochem.* **239**: 281-293.
- Wang, C.S., Huang, J.C., Hu, J.H. (1999). Characterization of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Mol. Biol.* **40**: 807-814.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., Gilchrist, D.G. (1996). Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* **8**: 375-391.
- Wang, J.C., Lynch, A.S. (1993). Transcription and DNA supercoiling. *Curr. Opin. Genes Dev.* **3**: 764-768.
- Wang, Z., Dröge, P. (1997). Long-range effects in a supercoiled DNA domain generated by transcription in vitro. *J. Mol. Biol.* **271**: 499-510.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P., Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094.
- Warner, S.A., Scott, R., Draper, J. (1992). Characterization of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins. *Plant Mol. Biol.* **19**: 555-561.
- Whitham, S., Dineshkumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*- similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78** : 1101-1115.

- Wolter, M., Hollricher, K., Lalamini, F., Schulze-Lefert, P. (1993). The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defense mimic phenotype. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 122-128.
- Xu, H.X., Heath, M.C. (1998). Rôle of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* **10**: 585-597.
- Xu, P., Narasimhan, M.L., Samson, T., Coca, M.A., Huh, G.H., Zhou, J.M., Martin, G.B., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1998). A nitrilase-like protein interacts with GCC box DNA-binding proteins involved in ethylene and defense responses. *Plant Physiol.* **118**: 867-874.
- Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A., Komiyama, T., Kitagawa, A., Ikezawa, Z. (1998). Plant defense-related enzymes as latex antigens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**: 379-385.
- Yang, K.-Y., Liu, Y.D., Zhang, S.Q. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 741-746.
- Ye, L., Li, Y., Fukami-Kobayashi, K., Go, M., Konishi, T., Watanabe, A., Sugiura, M. (1991). Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and a phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. *Nucl Acids Res.* **19**: 6485-6490.
- Yu, D., Chen, C., Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* **13**: 1527-1539.
- Yu, X.S., Ekramoddoullah, A.K.M., Misra, S. (2000). Characterization of Pim III cDNA in western pine. *Tree Physiol.* **20** : 663-671.

Zhang, S., Klessig, D.F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 7225-7230.

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

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