

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur en biologie de l'Université de Strasbourg

par

Olivier Habrylo

Une E.S.T. (Expressed Sequence Tag) conduit à la caractérisation, chez le houblon (*Humulus lupulus*), de trois inhibiteurs de xyloglucanase dont l'expression est influencée par des facteurs biotiques et abiotiques.

Soutenue publiquement le **26 août 2011**
devant la commission d'examen composée de :

M. Jan Delcour *Rapporteur*
Professeur à la Katholieke Universiteit Leuven (Belgique)

Mme Estelle Bonnin *Rapporteur*
Ingénieur de Recherche à l'INRA de Nantes

Mme Valérie Geoffroy *Examineur*
Maître de conférences à l'Université de Strasbourg

M. Patrice Rey *Examineur*
Professeur à l'ENITA Bordeaux

M. Jean-Marc Jeltsch *Examineur*
Professeur à l'Université de Strasbourg

M. Vincent Phalip *Directeur de thèse*
Maître de conférences à l'Université de Strasbourg

Résumé

Les pathogènes fongiques sécrètent un arsenal enzymatique pour dégrader la paroi végétale des plantes hôtes. Certaines de ces enzymes peuvent être inhibées par des protéines de plante. Une famille d'inhibiteurs, ayant la capacité d'agir sur les xyloglucanases et nommée XEGIP (*xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor protein*) est peu caractérisée et ce projet a permis la mise en évidence et l'étude de trois de ces protéines chez le houblon (*Humulus lupulus*). Des nombreuses preuves ont pu être accumulées sur le rôle potentiel de ces protéines dans la défense de la plante. À partir d'une EST (*Expressed Sequence Tag*), trois gènes (67 % d'identité nucléotidique), codants des XEGIPs ont été identifiés, clonés puis exprimés en cellules d'insectes. Des mesures d'activité enzymatique avec le substrat xyloglucane ont pu confirmer la fonction de ces protéines : en contact avec les protéines recombinantes, l'activité xyloglucanase des surnageants de culture d'*Aspergillus aculeatus* et de *Fusarium graminearum* a pu être inhibée pour l'inhibiteur n° 1 et l'inhibiteur n° 2 et non pour l'inhibiteur n° 3. La recherche d'enzymes cibles a conduit à la production, l'expression et la caractérisation de quatre protéines de GH12 de *F. graminearum* jusqu'alors non étudiées. Les analyses en PCR quantitative ont montré une distribution spatiale différente des inhibiteurs ainsi que l'existence d'une expression différentielle selon les variétés. Une tendance générale de l'expression de l'inhibiteur n° 1 et l'inhibiteur n° 2 a montré une induction préférentielle respectivement lors de stress abiotiques ou biotiques. L'inhibiteur n° 3 présente une surexpression importante lors de la germination au stade cotylédons ou dans les fleurs femelles en comparaison à celle de la graine.

Abstract

Phytopathogenic fungi secrete a powerful arsenal of enzymes potentially active on each polysaccharide layer of the plant cell. As a first line of defense, plant cell walls contain several inhibitors to specifically inhibit the activity of these microbial enzymes. In the present study we describe the identification and characterization of three xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor proteins (XEGIPs) from hop (*Humulus lupulus*). Some evidences have been accumulated about the role of these XEGIPs in plant defense. Starting from an expressed sequence tag three genes were isolated by the rapid amplification of cDNA ends, cloned and corresponding proteins expressed in insect cells. The functions of the proteins were validated by enzymatic activity measurements were performed with xyloglucan as substrate. Inhibitor n° 1 and inhibitor n° 2 were shown to inhibit the hydrolytic activity of xyloglucan-specific endoglucanase from the fungi *Aspergillus aculeatus* and *Fusarium graminearum*. The investigation on target enzymes lead to production, expression and characterization of four unknown GH12 from *F. graminearum*. Real-time PCR have shown variations in the spatial distribution of inhibitors and differential expression between hop cultivars. The main lines are the following : inhibitor n° 1 is expressed as a result of wounding and inhibitor n° 2 is inducible by *F. graminearum*. Inhibitor n° 3 could be have a physiological function with a positive regulation during the germination stages and in the female hop cones.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier à remercier les membres du jury ayant accepté de juger ces travaux. Merci au Président du jury, le professeur Patrice Rey, d'avoir accepté cette responsabilité. Je te remercie d'avoir quitter Bordeaux pour le grand Est le temps d'une journée. Merci Patrice pour tes félicitations et pour le plaisir que tu as eu à retrouver ton ancien étudiant devenu docteur. Merci à Estelle Bonnin et Valérie Geoffroy pour les nombreuses questions que vous m'avez posées tant lors de la lecture du manuscrit que lors de la présentation. Merci également pour vos remarques constructives quant à ce projet et le travail qu'il a occasionné. Merci au Professeur Jan Delcour, qui m'a fait l'honneur de sa présence. Merci pour votre sympathie, votre intérêt pour ce projet et nos futures collaborations. Merci au Professeur Jean-marc Jeltsch pour avoir participé à ce jury et surtout pour ces discussions scientifiques tout au long de ce doctorat, conversations certes parfois compliquées mais néanmoins toujours intéressantes et enrichissantes. Merci d'avoir initié cette belle thématique et d'avoir mis en évidence cette fameuse EST qui nous aura tenu en haleine pendant ces quelques années.

Merci à Vincent Phalip, cher directeur de thèse. Ce fût un plaisir de t'avoir eu comme encadrant. Il est certain que mon côté tête a dû parfois t'exaspérer mais il faut bien reconnaître tes grandes qualités, tant scientifiques que pédagogiques. Je ne suis pas déçu d'avoir découvert le monde de l'enzymologie, les joies des chromatographies et toutes ces choses *protéines-dépendantes* que tu m'as sympathiquement mis en face des yeux. Merci d'avoir toujours gardé espoir sur ce sujet et pendant aussi longtemps. Merci aussi de m'avoir laissé m'investir (grandement) associativement (d'un autre côté, t'ai-je laissé le choix ;-)))!

Merci à l'ensemble des collègues de bureau. Merci à Anne Forster pour ton implication dans ce projet. Nul doute qu'il n'aurait pu se poursuivre sans ton investissement. Les résultats présentés dans ces quelques dizaines de dizaines de pages sont également les tiens. Merci d'avoir partagé ces échecs, ces manipulations ne fonctionnant pas, ces activités enzymatiques inébranlables ... Au final, on les aura eu nos inhibitions! Merci aussi pour tes délicieux bredeles (bredala, bredle, Winachtsbredele, ...), ta sympathie et nos discussions de paillasse! Tes conseils, ton expérience, ... Bref MERCI pour tout. Merci à Raphaël Carapito pour tes petits conseils, astuces en tout genre dont j'ai eu le plaisir de pouvoir bénéficier en début de doctorat. Merci à Cédric Falter pour ton aide pour les mots fléchés, à l'époque où on arrivait encore à les faire. Merci à Jérôme Duranton pour tes petits pains au chocolat et les gâteaux *made home* qu'on aura jamais vus (;-)). Merci à Philippe Debeire pour ta capacité à maîtriser ton mac, l'amusement que cela m'a conféré et pour m'avoir fait découvrir que le papier millimétré était toujours d'actualité. Vous avez tous contribué à faire de ce doctorat un long et doux moment à vivre (ok j'en rajoute un peu), alors MERCI à vous tous.

Je dois ma présence en Alsace à Pauline que je remercie chaleureusement. Merci de m'avoir appris un soir d'été l'existence de ce sujet, alliant plante et champignon. Sans toi, je serai passé à côté d'*Humulus lupulus*! Alors un grand MERCI Pauline.

Merci et désolé également aux ami(e)s qui ont dû me supporter en vacances. Le sud avec Audrey et Céline, Solène; je sais que vous en avez souffert! On ne sort pas indemne après un an de doctorat. Avouez que vous pensez à moi quand vous faites la vaisselle! La Slovénie avec mon super pote Mat; la Bavière, Thèière et tous ces trucs qui nous feront toujours rire. Merci d'être présent depuis toutes ces années et encore MERCI d'être venu de si loin pour cette journée de fin août. Merci à Amandine; bon les scientifiques, ce n'est pas l'espèce que tu préfères mais quand même, tu étais toujours là et même après nos péripéties aux pays baltes. Oui oui, on a trouvé de l'ambre, des bisons, des castors – oui oui, on a perdu une vitre, une girouette et quelques habits – oui oui, c'était plutôt des chouettes vacances! Merci à Elise pour avoir eu cette brillante idée d'Irlande. Le retourne-montons on l'a fait avec presque un sans faute; le rétro aussi; ces arnaques touristiques ♠; le fameux "*oh, it was a special one*"; ces bons moments passés ensemble qui m'ont fait plusieurs fois me demander : à quand nos prochaines vacances ensemble pour revoir ce joli sourire que j'aime tant se dessiner sur tes lèvres.

C'est probablement grâce à l'Addal que l'enfer de l'absence de résultats ne m'a pas conduit à un départ précipité loin d'ici. Merci à tous *ces gens-là* [pour citer Brel] que j'ai eu plaisir à connaître, les personnes qui m'ont ouvert les yeux sur l'ensemble des compétences que possède les jeunes chercheurs, ceux qui m'ont permis de m'investir pour cette communauté, de me changer les idées et d'acquérir ces compétences transversales si précieuses. Merci ainsi à Simon pour tes discours sur la politique doctorale, Martine pour m'avoir initié à la conviv, Mag pour ton professionnalisme, Caroline pour m'avoir écouté lors de mes lamentations de Président, Vic pour avoir géré à merveille Conviv', Mike pour tes deux barrages, Elise pour ton super suivi des subventions, sans oublier Delphine, Etienne, Jojo, Lucas, Manu, TonY, ...

Merci à la HoTeXline et à ces compères du LSIIT pour toute l'aide fournie lors de l'utilisation de L^AT_EX, B^IB_TE_X ou encore beamer!

Sans oublier les ami(e)s d'un jour, de toujours, d'un week-end, d'une vie qui eux aussi ont participé de près ou de loin à cette aventure : Céline marraine de l'esmi, Célinette, Don't

Kry, Isa, Jenny, Julia Roberts, Julio, Kim, Marie, Mélanie, Sofia, Tjaša, Younès. . . Enfin merci aux personnes que je n'ai pas citées et qui auraient dû, ainsi que ceux ayant contribué à rendre ce doctorat moins pénible à certain moment et même passionnant aux autres et ayant participé à faire de ce 26 août 2011 un très beau souvenir.

Merci à vous, chers parents, pour m'avoir donné l'éducation nécessaire pour entreprendre un doctorat. Merci à vous et à toi également chère Nadège pour la co-organisation de la soutenance et enfin merci à toi maman pour m'avoir bien fait rire pendant les corrections avec ta prononciation de certains mots scientifiques : clown pour clone, chaperole pour chaperone, pitchia pour *Pichia*, . . .

Enfin, je remercie ma bonne étoile, présente depuis déjà de nombreuses années, m'ayant probablement évité bon nombre d'accidents à vélo – *avenue de Colmar* – et dont l'idée qu'elle se trouve à mes côtés m'apporte un réconfort, une confiance et une sûreté inégalable ✦.

À *Humulus lupulus*...

SOMMAIRE

Résumé / Abstract	iii
Remerciements	v
Sommaire	xi
1 Introduction bibliographique	1
1.1 <i>Humulus lupulus</i> Linné	3
1.1.1 Description générale	3
1.1.2 Croyances, traditions et utilisations	3
1.1.3 La culture du houblon	4
1.1.4 Le houblon en France, une identité régionale, propre à l'Alsace	5
1.1.5 Maladies, pathogènes et moyens de lutte	6
1.1.5.1 Insectes	7
1.1.5.2 Les pathogènes d'origine fongique	9
1.1.6 La recherche scientifique sur le houblon	13
1.2 Les interactions hôtes-pathogènes	14
1.2.1 Paroi végétale	14
1.2.1.1 Généralités	14
1.2.1.2 Cas du houblon	16
1.2.2 Les enzymes de dégradation de la paroi	18
1.2.2.1 Généralités	18
1.2.2.2 CWDEs et interactions pathogènes	19
1.2.3 Les mécanismes de défense de la plante	20
1.2.3.1 Perception et signalisation	23
1.2.3.2 Réactions de défense	23
1.3 Les inhibiteurs de CWDEs	27
1.3.1 Les protéines inhibitrices des polygalacturonases	29
1.3.2 Les inhibiteurs de xylanases	29
1.3.2.1 <i>Triticum aestivum xylanase-inhibitor</i>	29
1.3.2.2 <i>Xylanase-inhibitor protein</i>	30
1.3.2.3 <i>Thaumatococcus-like xylanase inhibitor</i>	30
1.3.3 Les protéines inhibitrices de xyloglucanases	31
Contexte et objectif du projet de recherche	33

2	Caractérisation de trois inhibiteurs de xyloglucanase chez le houblon	35
2.1	Introduction	37
2.2	Matériel et Méthodes	38
2.2.1	Matériel biologique	38
2.2.1.1	Plants de houblon	38
2.2.1.2	Microorganismes	38
2.2.2	Outils et techniques de biologie moléculaire	38
2.2.2.1	Séquence EST initiale	38
2.2.2.2	Extraction d'ADN plasmidique et d'ARN	38
2.2.2.3	Synthèse d'ADNc et Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	38
2.2.2.4	Amplification d'acides nucléiques et clonage	39
2.2.3	Bioinformatique	40
2.2.3.1	Analyse des séquences	40
2.2.3.2	Prédiction de la séquence signal et de la localisation	41
2.2.3.3	Prédiction des ponts disulfures et des sites de glycosylation	41
2.2.3.4	Analyses phylogénétiques	41
2.3	Résultats	42
2.3.1	EST codant un fragment d'inhibiteur de xyloglucanase	42
2.3.2	Obtention de trois gènes codant des XEGIPs	43
2.3.2.1	Identification d'un gène codant une XEGIP chez le plant mâle	43
2.3.2.2	Identification de gènes codant des XEGIPs chez le plant femelle	47
2.3.3	Caractérisation des trois XEGIPs	51
2.3.3.1	Données générales	51
2.3.3.2	Homologie dans les bases de données	53
2.3.3.3	Occurrence	56
2.3.3.4	Variations génétiques	57
2.3.3.5	Distribution spatiale	57
2.4	Discussion	58
3	Production, expression et purification	61
3.1	Introduction	63
3.2	Matériels et méthodes	64
3.2.1	Microorganismes utilisés	64
3.2.1.1	Souches bactériennes et vecteurs d'expression	64
3.2.1.2	Levure et vecteurs d'expression	64
3.2.1.3	Cellules d'insectes et vecteurs d'expression	65
3.2.2	Techniques de biologie moléculaire	65
3.2.2.1	Extraction d'ADN et purification	65
3.2.2.2	Clonage	65
3.2.3	Culture et production protéique	71
3.2.4	Préparation des protéines solubles	71
3.2.5	Préparation des protéines insolubles et renaturation	72
3.2.6	Purification de protéines	73
3.2.7	Analyses des protéines	74
3.2.8	Immunodétection	75
3.2.8.1	Production des anticorps primaires	75
3.2.8.2	Purification des anticorps primaires	75
3.2.8.3	Western-Blot	76
3.2.9	Analyse en spectrométrie de masse	77
3.3	Résultats	78
3.3.1	Premiers essais en système bactérien	78
3.3.1.1	Travaux sur les protéines solubles	78
3.3.1.2	Travaux sur les corps d'inclusion	81
3.3.2	Utilisation d'autres systèmes de production	84
3.3.2.1	Utilisation des souches ArcticExpress™, Origami™2(DE3) et SHuffle™	84

3.3.2.2	Utilisation du pET-39b	86
3.3.3	Production en système <i>Pichia pastoris</i>	88
3.3.3.1	Production intracellulaire avec le vecteur pPICZB	88
3.3.3.2	Production dans le milieu extracellulaire	90
3.3.4	Production en cellules d'insectes	90
3.3.4.1	Production avec le vecteur pAcSG His	90
3.3.4.2	Production avec le vecteur pAcGP67B	92
3.4	Discussion	94
4	Interactions entre les XEGIPs du houblon et des enzymes cibles	97
4.1	Introduction	99
4.2	Matériels et méthodes	100
4.2.1	Enzymes utilisées	100
4.2.2	Substrats utilisés et mesure de l'activité enzymatique	100
4.2.3	Tests d'inhibition enzymatique	101
4.2.4	GH12 de <i>F. graminearum</i>	101
4.2.4.1	Clonage des GH12	101
4.2.4.2	Culture et purification des GH12	102
4.2.4.3	Caractérisation des GH12 et spécificité de substrat	102
4.2.5	Immunodétection	102
4.2.6	Outils statistiques	103
4.2.7	Bioinformatique	103
4.3	Résultats	104
4.3.1	Résultats des tests d'inhibition à partir des inhibiteurs produits dans <i>E. coli</i> et dans le vecteur pAcSG en cellules d'insectes	104
4.3.2	Résultats des tests d'inhibition à partir des inhibiteurs dans le vecteur pAcGP67B en cellules d'insectes	106
4.3.2.1	Tests préliminaires sur le Viscozyme	106
4.3.2.2	Confirmation des essais d'inhibition après optimisation des cultures en pAcGP67B et travaux sur les surnageants de culture de <i>F. graminearum</i>	108
4.3.2.3	Tests d'inhibition sur les surnageants de culture de <i>F. graminearum</i>	111
4.3.3	Etude et caractérisations de GH12 de <i>F. graminearum</i>	114
4.3.3.1	Clonage des quatre GH12 de <i>F. graminearum</i>	114
4.3.3.2	Caractérisation des quatre GH12 de <i>F. graminearum</i>	117
4.3.3.3	Interaction entre les inhibiteurs et les enzymes de <i>F. graminearum</i>	118
4.4	Discussion	120
4.4.1	Protéines recombinantes produites dans <i>E. coli</i> et absence de capacité inhibitrice	120
4.4.2	Résidus impliqués dans l'inhibition des XEGIPs de houblon	122
4.4.3	Capacité d'inhibition et enzymes cibles	125
4.4.4	Les GH12 de <i>F. graminearum</i> , cibles potentielles des XEGIPs	125
4.4.5	XEGIPs de houblon et défense de la plante	126
5	Travaux sur la plante	129
5.1	Introduction	131
5.2	Matériels et Méthodes	132
5.2.1	Matériels biologiques	132
5.2.1.1	Plants de houblon	132
5.2.1.2	Champignons	132
5.2.2	Analyse protéique	133
5.2.2.1	Extraction protéique	133
5.2.2.2	Analyse des protéines	133

5.2.2.3	Techniques visant à la suppression de la RuBisCO dans les extraits protéiques du houblon	133
5.2.3	Immunodétection	134
5.2.4	Matériels génomiques	134
5.2.5	PCR	134
5.2.6	PCR quantitative	134
5.2.6.1	Aspects généraux	134
5.2.6.2	Amorces des inhibiteurs et gène de référence	135
5.2.6.3	Calcul de l'expression des gènes	136
5.2.7	Bioessais et validation des postulats de Koch	136
5.2.8	Expression des gènes chez le houblon	136
5.2.9	Expression des gènes face à un stress abiotique et un stress biotique	137
5.3	Résultats	138
5.3.1	Bioessais et postulats de Koch	138
5.3.2	Expression protéique des inhibiteurs du houblon	140
5.3.3	Méthodes utilisées pour la suppression de la RuBisCO	140
5.3.3.1	Technique immunologique	141
5.3.3.2	Utilisation du PEG	141
5.3.3.3	Utilisation du couple acide phytique et chlorure de calcium	142
5.3.4	Mise en place de la PCR quantitative	144
5.3.4.1	Spécificité des amorces	144
5.3.4.2	Analyse des données	145
5.3.5	Expression des inhibiteurs	146
5.3.5.1	Etude de l'expression relative des inhibiteurs selon les variétés	147
5.3.5.2	Etude de l'expression relative des inhibiteurs lors de la germination	149
5.3.5.3	Etude de l'expression spatiale relative des inhibiteurs	151
5.3.5.4	Etude de l'expression relative des inhibiteurs face à un stress abiotique et biotique	153
5.4	Discussion	158
5.4.1	Distribution spatiale et temporelle des inhibiteurs	158
5.4.2	Stress abiotique et stress biotique	159
5.4.3	Rôle des inhibiteurs	161
	Conclusion générale	163
	Annexes	167
	A Liste des abréviations et des acronymes	169
	B Table des figures	171
	C Liste des tableaux	175
	Bibliographie	177

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

1.1	1.1 <i>Humulus lupulus</i> Linné	3
	1.1.1 Description générale	3
	1.1.2 Croyances, traditions et utilisations	3
	1.1.3 La culture du houblon	4
	1.1.4 Le houblon en France, une identité régionale, propre à l'Alsace	5
	1.1.5 Maladies, pathogènes et moyens de lutte	6
	1.1.5.1 Insectes	7
	1.1.5.2 Les pathogènes d'origine fongique	9
	1.1.6 La recherche scientifique sur le houblon	13
1.2	1.2 Les interactions hôtes-pathogènes	14
	1.2.1 Paroi végétale	14
	1.2.1.1 Généralités	14
	1.2.1.2 Cas du houblon	16
	1.2.2 Les enzymes de dégradation de la paroi	18
	1.2.2.1 Généralités	18
	1.2.2.2 CWDEs et interactions pathogènes	19
	1.2.3 Les mécanismes de défense de la plante	20
	1.2.3.1 Perception et signalisation	23
	1.2.3.2 Réactions de défense	23
1.3	1.3 Les inhibiteurs de CWDEs	27
	1.3.1 Les protéines inhibitrices des polygalacturonases	29
	1.3.2 Les inhibiteurs de xylanases	29
	1.3.2.1 <i>Triticum aestivum xylanase-inhibitor</i>	29
	1.3.2.2 <i>Xylanase-inhibitor protein</i>	30
	1.3.2.3 <i>Thaumatococcus-like xylanase inhibitor</i>	30
	1.3.3 Les protéines inhibitrices de xyloglucanases	31

1.1 *Humulus lupulus* Linné

1.1.1 Description générale

Le nom *Humulus* aurait pour origine le slave « chmele ». D'autres auteurs pensent que *Humulus* serait un diminutif du mot latin humus. Le mot houblon vient du vieux-néerlandais « hoppe » (duquel dérive le terme anglais « hop ») ou du francique « hummol » [Faivre et al., 2007]. Le houblon, *Humulus lupulus*, appartient à la famille des Cannabinacées comprenant deux genres distincts : *Cannabis* et *Humulus*. Le genre *Cannabis* comporte une seule espèce, *Cannabis sativa*. Le genre *Humulus* présente quant à lui trois espèces : *Humulus lupulus*, (Figure 1.1, page 3) *Humulus japonicus* et *Humulus yunnanensis*. L'espèce cultivée, *H. lupulus*,



Figure 1.1 – Lithographie représentant *Humulus lupulus*.¹

est indigène à l'hémisphère Nord entre les latitudes 35° et 70°N et apparaît spontanément dans les haies et lisières des bois. *H. japonicus* est répandu en Chine et en Asie [Neve, 1991].

Il s'agit d'une plante dioïque, à souche vivace et à tiges volubiles annuelles. Ses feuilles sont dentées, opposées à 3-5 lobes. Les fleurs mâles disposées en grappes rameuses, opposées, axillaires ou terminales, ont un périanthe à 5 divisions presque égales et 5 étamines. Les fleurs femelles sont groupées par deux à l'aisselle de bractées, formant des chatons pédonculés, appelés cônes (Figure 1.2, page 4). La base de chaque bractée est couverte de glandes résineuses jaunes, odorantes et aromatiques produisant entre autres la lupuline (ensemble d'huiles et de résines) utilisée à des fins brassicoles [Bois, 1996].

1.1.2 Croyances, traditions et utilisations

Bien que le houblon soit aujourd'hui utilisé presque exclusivement en brasserie, cette plante a tout d'abord été cultivée pour ses propriétés thérapeutiques et médicinales, mêlant folklore, traditions et preuves scientifiques. On lui reconnaît notamment des propriétés

1. La liste des figures ainsi que les sources sont rassemblées en fin de manuscrit, page 171.



Figure 1.2 – Cônes femelles de houblon

sédatives et hypnotiques ainsi que des actions bactéricides, bactériostatiques et fongistatiques. Son utilisation intervient également dans les cas de rhumatismes, d'ulcères, de plaies et même comme substitut au tabac durant la seconde guerre mondiale pour ses propriétés narcotiques [Watts, 2007, Faivre et al., 2007].

C'est au Moyen Âge que l'usage du houblon s'est répandu pour aromatiser la bière. Il est question d'houblonnières pour la première fois en 768. Au XIV^e siècle, la culture du houblon était importante en Allemagne et commença vraisemblablement en Angleterre deux siècles plus tard [Bois, 1996]. Malgré un développement important de la consommation de la bière, la culture du houblon est restée cantonnée dans un petit nombre de pays, et pour chacun d'eux, dans des régions spécifiques. À l'heure actuelle, deux régions françaises produisent du houblon : l'Alsace avec 95 % de la production et le Nord.

1.1.3 La culture du houblon

La culture du houblon est effectuée en surfaces parsemées de perches de 8 à 12 m et de fils de tuteurages (Figure 1.3, page 5). Le houblon nécessite une terre riche et ne se cultive que sur de petites surfaces en raison des soins exigés par les houblonnières. Les cultivars actuels ont des origines diverses et résultent de sélections variétales, pouvant remonter jusqu'au VIII^e siècle. 3 000 à 3 500 pieds sont plantés par hectares, tous produits par multiplication végétative et issus de cultivars standards. Cette technique a de nombreux avantages dont le premier est d'obtenir une quantité importante de clones dans un court laps de temps. En outre, la micropropagation permet de maintenir les caractères génétiques des plants clonés, sans variations génétiques comme l'étude de Peredo et collaborateurs l'a montré (il est néanmoins à noter que des variations épigénétiques ont été mises en évidence. Il s'agit de modifications transmissibles d'une génération à l'autre et réversibles de l'expression des gènes sans altération des séquences nucléotidiques.) [Peredo et al., 2009]. De nombreuses variétés sont disponibles sur le marché, issues de croisements entre mâle et femelle sauvages et de variétés définies, avec des caractéristiques différentes comme leur rendement, leur production en acides- α , leur capacité à résister aux maladies, leur pouvoir aromatisant ou amer, leur stabilité au stockage, ...

Les pieds ne deviennent productifs qu'après la 3^e année rendant la culture économiquement non rentable durant les premières années. D'une hauteur de 8 à 12 mètres selon les variétés, les plants ont une durée de vie variable, de l'ordre de 20 ans en Alsace. Seules les plantes femelles sont cultivées ; en effet, une fécondation du cône femelle occasionnerait

le développement de la graine et ainsi une diminution de la lupuline récupérée. La phase « huile » de la lupuline et sa proportion par rapport à la phase « résine » jouent un rôle important dans l'arôme et le goût de la bière. Les résines de la lupuline se composent en acides- α et des acides- β (contenant respectivement l'humulone et la lupulone) et vont conférer l'amertume de la bière. La valeur commerciale du houblon est déterminée par la teneur en acides- α des cônes.

En 2009, le houblon représentait 56 645 hectares au niveau mondial et 32 692 hectares en Europe. Parmi les 14 pays européens producteurs, l'Allemagne compte 60 % des terres cultivées, puis la République Tchèque avec 17 %. La France détient la 6ème place, après la Pologne, la Slovénie et l'Angleterre, avec 533 hectares au moment de l'édition de ce rapport [Group, 2010].



Figure 1.3 – Houblonnières.

1.1.4 Le houblon en France, une identité régionale, propre à l'Alsace

Organisée sous forme de coopérative, la COPHOUDAL² (coopérative des producteurs de houblons d'Alsace) produit la majeure partie du houblon français. Durant les dernières années, cette culture a subi de nombreux changements, tant économiques que sociétaux.

La particularité de la région alsacienne est la production d'une variété à fort pouvoir aromatique : le Strisselspalt. Cette dernière représente l'essentiel de la production, avec 612 hectares en 2008 soit 80 % de la surface cultivée [Weiss, 2009b]. Durant de nombreuses années, le principal client de la société fût la brasserie Anheuser Bush. En 2003, cette brasserie américaine souhaita réduire ses achats de manière significative occasionnant alors une baisse de production de 20 % du houblon alsacien [Weiss, 2009b]. L'année 2007 a été caractérisée par une pénurie à l'échelle mondiale entraînant la création de nouvelles surfaces de production en 2008. L'année 2008 a, quant à elle, été exceptionnelle par son rendement et sa forte teneur des cônes en acides- α et cela dans le monde entier. 2009 a ainsi été confrontée à un marché en surproduction et à un problème de taille : le changement des goûts du consommateur. La demande pour les bières traditionnelles s'effondre alors au profit de bières légères, avec des niveaux d'amertume nettement inférieurs [Péry, 2004]. Mi-2008, après une fusion,

2. La liste des acronymes et des abréviations utilisés sont rassemblées en fin de manuscrit, page 169.

Anheuser Busch devient InBev. Ce dernier achetant alors 65 % de la production de Strisselspalt, rompt le contrat la liant avec la COPHOUDAL. 320 hectares sur les 770 ont ainsi été arrachés en 2009, en vue de l'introduction d'une nouvelle variété au potentiel commercial plus important [Weiss, 2009a, Weiss, 2010]. En 2010, afin d'éviter une nouvelle situation de surproduction, la coopérative a demandé aux producteurs de réduire l'ensemble des surfaces de 25 %. Le tableau 1.1 (page 6) illustre les éléments décrits dans ce paragraphe.

Tableau 1.1 – Evolution de la superficie des surfaces houblonnières en France.³

Localisation	Variétés	Superficie en hectares	
		2008	2009
Alsace		2008	2009
	Strisselspalt	613	288
	Autres aromatiques	136	194
	Total des aromatiques	749	482
	Amer	4	4
	Riche en alpha	749	482
	Total Alsace	773	503
Nord		2008	2009
	Aromatiques	2	12
	Amer	4	4
	Riche en alpha	22	14
	Total Nord	28	30
Total France		801	533

Une culture basée sur une seule variété, une demande pour les bières aromatiques en décroissance, des arrachages à répétition, ont conduit un certain nombre d'exploitants à abandonner cette culture traditionnelle, au profit d'autres cultures plus rentables et moins contraignantes (telles que le maïs). Les études de recherche et développement en entreprises depuis plus de 10 ans devraient conduire à une nouvelle phase de plantation qui sera engagée en 2011–2012 avec de nouvelles variétés, plus aromatiques et plus riches en amertume. Le rapprochement en 2010 de la COPHOUDAL avec le Comptoir Agricole (Coopérative alsacienne) devrait permettre de trouver de nouveaux débouchés à la filière du houblon assurant ainsi sa pérennité [Klotz, 2010]. Ainsi en mars 2011, la nouvelle variété nommée ARAMIS est commercialisée conciliant les arômes de la variété Strisselspalt et une amertume accrue [Klotz, 2011].

1.1.5 Maladies, pathogènes et moyens de lutte

Comme toute plante, le houblon est soumis à un certain nombre de ravageurs : virus, viroïdes, bactéries, insectes, champignons et nématodes. Cette partie présente les plus importants d'entre eux et les moyens de lutte utilisés pour contrer ces attaques. L'équilibre entre pathogènes, prédateurs naturels, produits phytosanitaires y sera également abordé. Comme

3. La liste des tableaux ainsi que les sources sont rassemblées en fin de manuscrit, page 175.

le rapport européen de l'agriculture et du développement [Direction Générale de l'Agriculture et du Développement Rural, 2009] le mentionne, les stratégies de lutte intégrées sont clairement sous-développées en houblonnières. La culture du houblon sans l'utilisation des pesticides devrait être un idéal en terme d'écologie, mais n'est pas réaliste à l'heure actuelle.

1.1.5.1 Insectes

Charançons, acariens, altises, pucerons, chenilles défoliatrices ou encore pyrales du maïs font partie des insectes nuisibles des houblonnières alsaciennes. La figure 1.4 (page 7) présente un aperçu de ces nuisibles. L'attention sera portée sur deux insectes, pour leur fréquence et leur fort pouvoir destructeur.

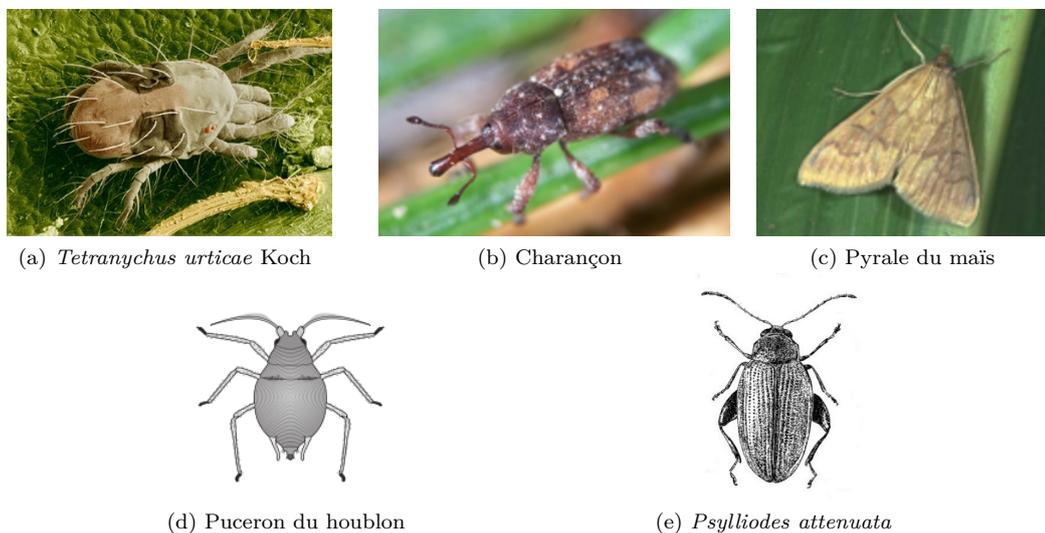


Figure 1.4 – Les insectes nuisibles du houblon.

1.1.5.1.1 Le puceron du houblon

Ce puceron, *Phorodon humuli* Schank (Hemiptera : Aphididae), est le parasite majeur des houblonnières, causant des dégâts par leur alimentation directe (affaiblissement de la plante, défoliation) mais également par leur capacité à être vecteur de virus (*Carlavirus* : virus de la mosaïque du houblon ; *Ilarvirus* : virus des anneaux nécrotiques du prunier ; *Nepovirus* : virus de la mosaïque de l'arabis). Le houblon intervient en tant qu'hôte d'été, c'est-à-dire un hôte secondaire. Tout d'abord regroupés sur les jeunes pousses, les pucerons vont par la suite migrer au niveau des cônes et se loger à travers les bractées, rendant difficile la lutte contre ces insectes. Le miellat formé sur les feuilles devient le support de moisissures, pouvant entraîner de sérieuses conséquences en terme de valeurs commerciales des cônes [Neve, 1991].

La lutte contre *P. humuli* se déroule essentiellement par l'utilisation de produits chimiques. Le premier cas de résistance aux pesticides apparaît en 1966 pour un premier organophosphate, et un second dans les dix ans qui suivent. De 1970 à 1990, on constate une

augmentation des cas de résistance aux carbamates et pyrethroides, deux autres composés de pesticides. À la fin des années 80, des résistances sont enregistrées sur pratiquement l'ensemble des insecticides utilisés.

Le faible nombre de références de produits phytosanitaires augmente indéniablement les risques de résistance des insectes [Weichel and Nauen, 2003]. Ainsi, concernant les pucerons, il a été mentionné en Alsace des phénomènes de résistances il y a quelques années face au produit commercial, le KARATE®. L'arrivée du PLENUM® a permis d'éviter le Karaté pendant plusieurs saisons. Récemment, ce nouveau produit s'est montré moins efficace et des suspicions de résistances ont été avancées. L'année 2010 ayant été une année faible en pucerons, il est à espérer que l'utilisation de ce nouveau produit sera encore d'actualité pour les prochaines saisons.

L'utilisation d'insectes auxiliaires comme la coccinelle (Coccinellidae) pourrait apporter une nette amélioration, comme l'a montré une étude dans les houblonnières du Nord de la France [Trouve et al., 1997]. Le rapport européen de l'agriculture et du développement [Direction Générale de l'Agriculture et du Développement Rural, 2009] fait également mention du cas de l'Alsace ayant expérimenté l'utilisation avec succès de la coccinelle *Harmonia axyridis* contre *P. humuli* il y a plusieurs années. Néanmoins ces pratiques ne sont que faiblement répandues en Alsace. Une autre étude [James, 2003] fait l'inventaire des pesticides et fongicides ayant un faible impact sur la faune auxiliaire, permettant ainsi malgré l'utilisation de produits chimiques, la préservation de ces prédateurs naturels.

1.1.5.1.2 L'arpenreuse du houblon

Hypena humuli (Lepidoptera : Noctuidae) est un parasite important aux USA, le plus abondant trouvé en culture. Une forte concentration de chenilles peut conduire à une défoliation importante et endommager le développement des cônes. En outre, leur seule présence peut, dans certains pays, faire baisser leur prix de vente [Grasswitz and James, 2008]. Présente au milieu du XIX^e siècle et au XX^e siècle, la population de l'arpenreuse du houblon avait largement diminué du fait de l'utilisation de pesticide à large spectre. L'inversion de cette tendance et l'apparition de produits phytosanitaires plus sélectifs ont permis à cet insecte de réapparaître pour devenir un insecte aussi fréquent que nuisible dans les houblonnières. Les recherches se tournent vers la lutte intégrée avec l'utilisation d'un pesticide spécifique aux lépidoptères, élaboré à partir de souches de *Bacillus thuringiensis* et obtenant des résultats concluants [Grasswitz and James, 2008].

1.1.5.1.3 Le tétranyque tisserand

La bonne efficacité des acaricides, à base de propargite, fait du tétranyque tisserand, *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidea), un acarien relativement bien contrôlé. Une étude de 2005, montre d'ailleurs qu'à un certain niveau d'infection, une absence de traitement ne présente que peu ou pas de risque de perte économique dans les houblonnières [Weihrauch, 2005]. Le produit OMITE® 30 WP utilisé en Alsace respecte, d'après la firme le commercialisant, la faune auxiliaire, notamment les acariens prédateurs. Utilisé depuis deux décennies en République Tchèque, les houblonniers s'attendent néanmoins à l'apparition de résistances. Un nouveau acaricide à base de bifenezate a ainsi été utilisé et a montré son efficacité. De faibles quantités sont nécessaires pour obtenir une mortalité de 100 % et ce

pesticide est considéré comme sélectif, faisant de celui-ci un candidat pour la protection raisonnée du houblon au niveau européen [Vostřel, 2010].

1.1.5.2 Les pathogènes d'origine fongique

Parfois spécifiques au houblon, parfois opportunistes, les champignons représentent la seconde cause des maladies du houblon et leurs symptômes sont illustrés en figure 1.5 (page 9).



(a) Pousse spiciforme (mildiou)



(b) Mildiou sur tige



(c) Oïdium sur cône



(d) Dépérissement sur feuille

Figure 1.5 – Aperçu de symptômes sur le houblon causés par des pathogènes fongiques.

1.1.5.2.1 Le mildiou du houblon

Le mildiou du houblon est causé par un champignon de la famille des Oomycota : *Pseudoperonospora humuli*. Cette maladie est apparue en 1905 au Japon, puis en Europe en 1920. Elle est l'une des plus dévastatrices des houblonnières. L'attaque de ce champignon occasionne une perte directe du rendement en cône et une commercialisation difficile du fait de la décoloration des cônes et de la diminution des taux d'acides- α . Dans les années 20, c'est sous forme de pandémie que le champignon s'est propagé. À l'heure actuelle, ce genre

d'attaque est moins commune du fait de l'utilisation de variétés résistantes et de l'utilisation systématique de fongicides. Néanmoins, en période hivernale, la présence de ce champignon au niveau de la moelle et du phloème voire dans le cortex des racines fait que des années successives d'attaque peuvent faire mourir la souche par épuisement.

Son évolution peut être divisée en quatre phases successives :

- l'apparition des pousses spiciformes au début du printemps (Figure 1.5a, page 9) ;
- l'envahissement général du limbe des jeunes feuilles (Figure 1.5b, page 9) ;
- l'attaque isolée sur les limbes plus âgés en fin de printemps ;
- l'attaque des cônes, qui découle directement du développement du champignon sur tous les étages foliaires.

La lutte contre le mildiou est dépendante des applications régulières des fongicides ainsi que le respect des bonnes pratiques culturales. Les traitements utilisés en Alsace associent des molécules actives bloquant la production de spores et inhibant la synthèse d'ARN (mefenoxam), des produits préventifs par la stimulation des défenses naturelles (fosétyl-aluminium) ou encore le cuivre couplé à des molécules curatives (cymoxanil) [Viennot-Bourgin and Heim, 1949, Dunez et al., 1988b, Neve, 1991].

1.1.5.2.2 L'oïdium du houblon

L'oïdium du houblon, causé par *Sphaerotheca humuli* (également appelé *Podosphaera macularis*) attaque les pousses feuillées et les cônes, aussi bien sur le houblon sauvage que sur les espèces cultivées. Sa découverte remonte au début du XVIII^e siècle en Angleterre et a entraîné la destruction de houblon en Europe de l'ouest et en Russie un siècle plus tard. Au printemps, si les conditions sont favorables, le champignon recouvre l'ensemble des jeunes pousses d'un feutrage blanc conduisant au dessèchement de la tige. Dans le cas de feuilles pleinement développées, des taches blanchâtres apparaissent de part et d'autre du limbe. En fin de saison, des périthèces apparaissent, contenant 8 ascospores. Du fait de la nécessité de l'eau pour leur germination, la propagation de l'oïdium se fera essentiellement via la production des conidies. Sur les cônes de houblon (Figure 1.5c, page 9), il est à noter que le champignon provoque un rougissement des bractées, occasionnant une fois encore, la baisse de la valeur commerciale des cônes [Viennot-Bourgin and Heim, 1949, Dunez et al., 1988a, Neve, 1991].

En Alsace, la perte du contrat avec la société Inbev, permet dorénavant l'utilisation du souffre qui, à l'état gazeux, entre en compétition avec l'oxygène dans les voies respiratoires. Les traitements sont répartis de la manière suivante : 4 traitements au souffre (surtout utilisé en lutte préventive) ; 2 traitements au trifloxystrobine (fongicide à large spectre, qui inhibe la germination des spores et la croissance mycélienne) ; 2 traitements à base de myclobutanil (bloquant la synthèse de l'ergosterol). Ces traitements chimiques n'excluent pas les bonnes pratiques culturales, qui consistent notamment en une taille plus tardive en saison et la destruction systématique des parties infectées.

1.1.5.2.3 Verticilliose

La verticilliose est souvent attribuée à *Verticillium albo-atrum*, et dans certains cas à *Verticillium dahliae*. Ces champignons ont un large spectre d'hôtes et ne sont pas spécifiques au houblon. Deux formes sont décrites : l'une modérée, qui varie en intensité d'une année sur l'autre et causant rarement la mort de la plante, et l'autre plus dangereuse dite progressive,

moins influencée par les variations climatiques mais responsable de symptômes sévères avec un rapide flétrissement de la plante. La verticilliose n'a généralement qu'une importance modérée en houblonnière à l'exception d'un passage destructeur en Angleterre dans les années 1940 [Neve, 1991].

1.1.5.2.4 Autres maladies

Outre ces trois principaux pathogènes, il existe d'autres champignons occasionnant des maladies sur le houblon. Le genre *Fusarium* est responsable d'un ensemble de maladies nommées fusarioses. L'espèce *F. graminearum* sera le modèle utilisé lors de ce projet dans le cadre de l'étude des mécanismes de pathogénicité.

Une des fusarioses les plus connues, touchant les graminées, est la fusariose de l'épi dont les pertes en champs peuvent atteindre 50 % en terme de rendement. Le champignon en cause est *F. graminearum*, la forme imparfaite, c'est-à-dire asexuée, de *Gibberella zeae* Schwabe. Ce champignon est facilement reconnaissable par la formation de macroconidies septées et fusiformes (Figure 1.6, page 11).

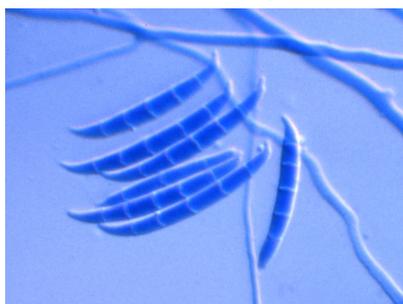


Figure 1.6 – Spores de *F. graminearum*.

Décrite pour la première fois en Angleterre en 1884, elle est maintenant présente dans le monde entier. Dans le cas des graminées, les grains sont directement touchés en terme de qualité, de quantité et de sécurité alimentaire. En effet, ce champignon a également la capacité de produire des mycotoxines tels que les trichothécènes (la plus répandue étant la DON : déoxinivalénol), la zéaralénone, la culmorine ou encore la fusarine C. Ces mycotoxines présentent des risques dans l'alimentation animale et humaine ayant pour conséquence des toxicités aiguës et chroniques allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil respiratoire, l'appareil digestif [Samson et al., 2000, Goswami and Kistler, 2004].

Sur le houblon, il se produit un dessèchement des pousses au printemps et des chancres brunâtres se forment à la base. En second temps les périthèces de *Gibberella* apparaissent, la forme sexuée de *F. graminearum*. Le développement de *F. graminearum* est conditionné par l'humidité du sol et la température [Viennot-Bourgin and Heim, 1949].

Fusarium sambucinum Fuckel, responsable du chancre fusarien, est le champignon du genre *Fusarium* le plus couramment décrit en tant que pathogène du houblon. Cette maladie apparaît sporadiquement en houblonnière lors de la taille des lianes au printemps et occasionne un flétrissement des lianes puis la mort de la souche. Elle touche particulièrement

la République Tchèque avec également quelques cas en Allemagne, Pologne et en Angleterre. Il est préconisé l'utilisation d'un fongicide à base de thiabendazole sans néanmoins s'affranchir des bonnes pratiques culturales minimisant les opportunités d'une attaque microbienne [Gryndler et al., 2008].

Alternaria alternata n'est pas reconnu comme un pathogène du houblon, néanmoins certains cas révèlent le caractère pathogène de ce champignon [Neve, 1991]. Il est régulièrement isolé lors de prélèvement dans les houblonnières alsaciennes et a pu être corrélé à des symptômes infectieux [Jeltsch et al., 2010]. La pourriture grise *Botrytis cinerea* nécessite des conditions optimales pour son développement et à l'exception de rares cas, ce champignon se retrouve principalement au Japon. *Cladosporium* a été observé sur des houblons infectés par *Alternaria* ou *Botrytis* [Neve, 1991] et l'espèce *C. cladosporioides* isolée au laboratoire dans les houblonnières alsaciennes [Jeltsch et al., 2010].

La pourriture noire des racines causée par *Phytophthora citricola* a été un sérieux problème en Nouvelle Zélande avant l'arrivée de cultivars résistants.

Amillaria mellea attaque les racines du houblon, mais uniquement dans les cas où la houblonnière se situe à proximité d'une source de bois contaminé du fait que ce champignon attaque d'abord les arbres.

Cercospora cantuariensis Salmon et Wormald est à l'heure actuelle étroitement surveillé, pour avoir causé en Autriche et en Slovénie sous une forme très virulente et occasionnant de sérieux dégâts sur les feuilles et les cônes [Radisek et al., 2009].

On peut également noter la présence de *Neofusicoccum parvum* dans les champs alsaciens, pathogène reconnu dont le spectre d'hôte est celui du poirier, du pommier, du manguier mais également du peuplier, de l'eucalyptus et de la vigne. Les symptômes ont été observés après la conaison sur trois parcelles de la même exploitation et sur plusieurs années. Ils apparaissent tout d'abord en haut de la liane, provoquant la mort de celle-ci au dessus d'un nœud et l'apparition d'un bleuissement de la tige figure 1.7 (page 12).



Figure 1.7 – Liane de houblon contaminée par *Neofusicoccum parvum*.

1.1.6 La recherche scientifique sur le houblon

On peut dissocier deux axes d'intérêt concernant les travaux de recherche sur le houblon.

Le premier correspond aux études de ses molécules actives. La pharmacognosie est en effet intéressée par les propriétés anticancéreuses [Monteiro et al., 2007], antibactériennes [Natarajan et al., 2008, Yamaguchi et al., 2009] ou encore antioxydantes du houblon [Liu et al., 2007, Yamaguchi et al., 2009]. Des flavonoïdes tels que la xanthohumol attirent plus particulièrement l'attention [Monteiro et al., 2006, Kac et al., 2008], et plus récemment les acides de la lupuline [Van Cleemput et al., 2009].

Le second axe concerne directement la brassiculture avec des recherches tournées vers la génétique. Elle prend une place importante par la recherche de marqueurs codant pour des gènes de résistance [Kozjak et al., 2009], pour des hauts niveaux de résines et d'huiles essentielles [Cerenak et al., 2009], pour des études de diversité génétique et de phylogénie [Murakami et al., 2006b, Murakami et al., 2006a, Strese et al., 2010] et globalement les sujets pouvant avoir une importance en brassiculture (microsatellites, marqueur moléculaire, changement génétique par micropropagation) [Jakše et al., 2002, Danilova and Karlov, 2006, Patzak et al., 2007, Peredo et al., 2009].

L'axe phytopathologie est beaucoup moins développé chez le houblon que chez les grandes cultures céréalières ; les surfaces exploitées étant minimales, les enjeux économiques moins importants et le nombre faible d'acteurs scientifiques dans le domaine du houblon [Forster et al., 2008, Gent et al., 2008, Gent et al., 2009, Gent et al., 2010].

1.2 Les interactions hôtes-pathogènes

La paroi est un des éléments clés des cellules végétales. Elle forme l'interface entre les cellules adjacentes, jouant ainsi des rôles importants dans la communication intercellulaire. Du fait de sa situation par rapport à l'environnement extérieur, elle entre directement en jeu dans les interactions plantes/microorganismes. En effet, lorsqu'un pathogène est face à une plante, il est confronté à un premier obstacle, une barrière physique : la paroi végétale. Constituée de plusieurs couches successives, la composition de cette paroi va conditionner les mécanismes mis en place par le pathogène pour passer outre cette barrière. Ces interactions plantes/champignons, et plus globalement plantes/pathogènes, sont en fait des phénomènes d'attaques et de contre-attaques. Des millions d'années de coévolution ont donné aux plantes des stratégies variées pour protéger leur paroi cellulaire et ont fourni aux pathogènes des moyens de contourner ces stratégies. Dans le cas des champignons, qui sera plus amplement abordé dans cette partie, c'est sous la forme d'un arsenal enzymatique que se déroule la première offensive pour franchir cette barrière.

L'étude ci-dessous abordera une première partie sur la composition de la paroi végétale, afin de comprendre au mieux les attaques enzymatiques des champignons contre cette structure complexe. En seconde partie, il sera question des enzymes de destructions de la paroi végétale produites par les pathogènes. Enfin, seront abordées les réponses de plantes, de manière générale, puis plus précisément la première ligne de défense : la synthèse d'inhibiteurs d'enzymes de dégradation de la paroi végétale.

1.2.1 Paroi végétale

1.2.1.1 Généralités

On confère à la paroi végétale deux rôles essentiels : un rôle de protection, comme mentionné ci-dessus, mais également un rôle dans la rigidité des cellules, déterminant ainsi leur taille et leur forme. La plupart des parois végétales des plantes sont composées de 14-40 % de cellulose, 30-40 % d'hémicellulose et de 20 % de pectine. Elles se présentent sous la forme de trois éléments (Figure 1.8, page 14) :

- la paroi primaire,
- la lamelle moyenne,
- la paroi secondaire.

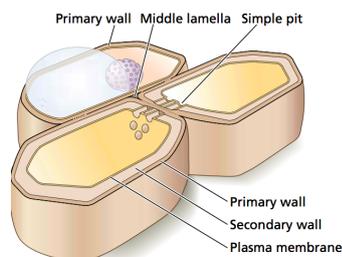


Figure 1.8 – Schéma de la paroi végétale.

La paroi primaire (Figure 1.9, page 15) est composée approximativement de 10 % de protéines (glycoprotéines riches en hydroxyproline) et de 90 % de polysaccharides, qui peuvent être divisés en trois groupes : la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. L'eau, ainsi que des ions associés à celle-ci, est bien sûr omniprésente dans cette structure complexe (jusqu'à 80 % de la masse de la paroi).

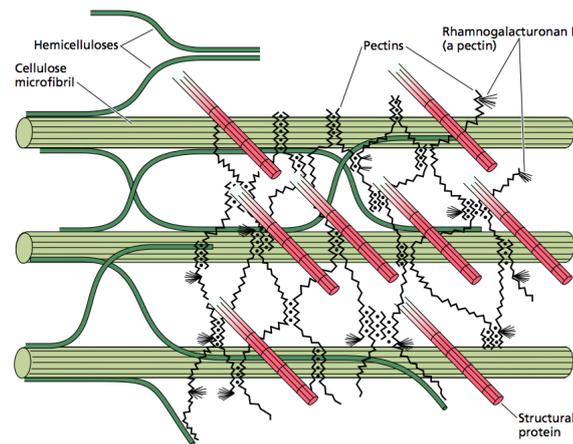


Figure 1.9 – Schéma de la paroi primaire.

La cellulose est un polymère formé de glucosyles reliés en liaison $\beta(1-4)$ et organisé régulièrement sous la forme d'agrégats cristallins : les microfibrilles, formant ainsi des feuillets rigides et résistants.

Les hémicelluloses présentent de nombreux monomères et de nombreux branchements différents. Chez les dicotylédones, les hémicelluloses les plus importantes sont les xyloglucanes, une ossature de résidus glucose en liaison $\beta(1-4)$ présentant des chaînes latérales de résidus de D-xylose, eux-mêmes pouvant être substitués de galactosyles, fucosyles ou arabinosyles (Figure 1.10). Bien que le degré de substitution du xylose varie considérablement, la structure

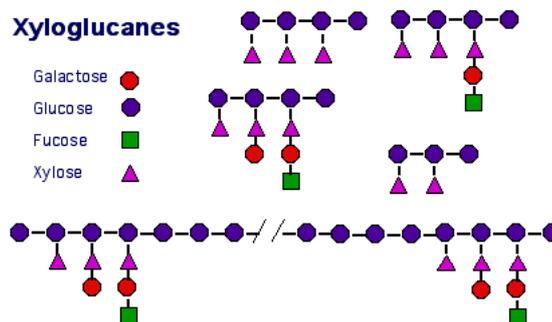


Figure 1.10 – Schéma des xyloglucanes.

de l'ossature en glucose est typiquement substituée à 50 % à 75 % par le xylose [Powlowski et al., 2009]. Les xyloglucanes peuvent ainsi être classifiés selon deux types : ceux de type XXXG et ceux de type XXGG, d'après la nomenclature décrite en figure 1.11 (page 16). La structure précise du xyloglucane est variable selon la plante et selon les tissus. Ainsi, le xyloglucane des graines de tamarinier est construit à partir d'heptasaccharide XXXG,

d'octosaccharides XXLG et XLXG, et de nonasaccharides XLLG. Le xyloglucane du pois contient essentiellement des XXXG ainsi que des nonasaccharides fucosylés XXFG et XFXG [Powlowski et al., 2009].

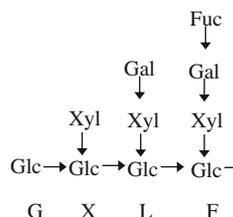


Figure 1.11 – Nomenclature utilisée pour décrire les segments de xyloglucane. Abréviations : Glc : glucose ; Xyl : xylose ; Gal : galactose ; Fuc : fucose.

Chez les monocotylédones, l'hémicellulose majeure est constituée majoritairement de xylane, un polymère de D-xylose en liaison $\beta(1-4)$, pouvant être également substitué par d'autres résidus (arabinose, acide glucuronique, acide 4-O-méthylglucuronique). Les hémicelluloses permettent le maintien de l'architecture composée de l'association de la cellulose/hémicellulose/liaisons hydrogène.

Les pectines constituent un ensemble complexe de macromolécules, composé de chaînes principales et de chaînes branchées. Les plus abondantes et également les plus étudiées des polysaccharides pectiques sont les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonan-I et -II [Lagaert et al., 2009].

La paroi secondaire présente une grande proportion de cellulose dont la disposition des microfibrilles en hélices et en strates confère la rigidité lui permettant d'assurer son rôle de soutien et de transport de la sève brute. La proportion en hémicellulose est réduite, mais elle contient un composant propre : la lignine. Il est à noter que les plantes sont capables de développer des couches cireuses constituées de cutine, de cire et de subérine. Ces constituants lipidiques ont un rôle de protection (comme à la surface des feuilles) et un rôle physiologique (limitation de la perte d'eau des tissus).

1.2.1.2 Cas du houblon

La composition de la paroi du houblon n'est que peu décrite dans la littérature et les données disponibles sont difficilement comparables, du fait de méthodes et de tissus analysés différents.

C. sativa jouissant d'une plus grande notoriété, notamment du fait de son utilisation dans l'industrie textile, des données sur la famille des Cannabinaceae sont néanmoins disponibles. La composition de tiges de chanvre (Tableau 1.2, page 17) ne présente aucune singularité, hormis néanmoins une part importante pour la cellulose (étude comparative par la méthode de Van Soest, valeurs en $\text{kg} \cdot 100 \text{ kg}^{-1}$ de matière sèche de chanvre, [Godin et al., 2010]).

Sipos et collaborateurs définissent quant à eux une concentration en lignine de l'ordre de 21 % en matière sèche de chanvre (tiges et feuilles), englobant la lignine soluble et insoluble (respectivement 6,5 % et 14,5 %) [Sipos et al., 2010]. La teneur en cellulose est évaluée à 44 % et celle en hémicellulose à 10 %.

Tableau 1.2 – Composition du chanvre d’après Godin.

Sucre	Pourcentage
cellulose	60,3 ± 6,2 %
hémicellulose	16,8 ± 3,9 %
lignine	6,8 ± 3,4 %

Le tableau 1.3 (page 17) présente la composition dans des feuilles de houblon en équivalents monomères d’oses [Glocker et al., 1993]. La quantité importante en acide galacturonique

Tableau 1.3 – Composition en oses de feuilles de houblon.

Sucres	Pourcentage en oses totaux
fucose	0,1
rhamnose	6,8
arabinose	14,8
galactose	12,9
glucose	16,6
xylose	8,2
acide galacturonique	39,5

et en rhamnose de ces échantillons s’explique par les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes, constituants principaux de la pectine. On note la présence d’autres constituants de la pectine : des monosaccharides d’arabinose et de galactose. La quantité importante en xylose et en glucose, respectivement 8,2 % et 16,6 %, suggère que le xyloglucane est présent à des taux importants. La cellulose peut également être présente via cette quantité de glucose [Glocker et al., 1993]. L’ensemble de ces deux constituants, moins de 25 %, est deux fois plus faible que les données du tableau 1.2 (page 17). Cette différence est essentiellement due aux tissus analysés (des feuilles) plutôt qu’à une particularité du houblon par rapport au chanvre.

Des données internes au laboratoire sont présentées dans le tableau 1.4 (page 17). Le matériel utilisé correspond à un mélange post-récolte contenant tiges et feuilles. Ces données sont cohérentes avec celles du tableau Sipos et collaborateurs, décrites précédemment.

Tableau 1.4 – Composition en sucres de déchets post-récoltes de houblon.

Sucres	Pourcentage
sucres totaux	35,2 %
glucane	20,1 %
xylane	2,7 %
lignine	30,9 %

Il est important de considérer que la dégradation des parois végétales joue un rôle important dans le cycle du carbone [Doi and Kosugi, 2004]. La complexité de cette paroi végétale laisse à supposer le nombre important d’enzymes que les microorganismes devront mettre en jeu pour la dégrader. Ces enzymes sont couramment appelées sous l’acronyme anglais

CWDEs : *Cell Wall Degrading Enzymes*. C'est également sous cette appellation qu'elles seront abordées dans la partie suivante.

1.2.2 Les enzymes de dégradation de la paroi

Deux aspects complémentaires seront abordés dans cette partie. Il sera question en premier lieu de généralités sur les CWDEs. La seconde section relatera leur rôle dans les phénomènes de pathologie végétale et illustrera les prémices des interactions plantes/champignons.

1.2.2.1 Généralités

Les champignons produisent naturellement un grand nombre d'enzymes d'hydrolyse des oligo- et polysaccharides. Certaines d'entre elles sont d'ailleurs couramment utilisées en industrie. Le tableau 1.5 (page 18) présente l'étendue des secteurs concernés par l'utilisation de ces enzymes fongiques [Kavanagh, 2005]. Leur utilisation dans la valorisation de la biomasse

Tableau 1.5 – Importance des enzymes fongiques en industrie.

Enzyme	Application	Source
Amylase	Traitement de l'amidon	<i>Aspergillus niger</i>
Cellulase	Modification de la cellulose et de l'hemicellulose	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Protease	Hydrolyse protéique	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i>
Lipase	Traitement des huiles végétales	<i>Rhizopus oryzae</i>
Phytase	Relargage du phosphore à partir d'acide phytique	<i>Aspergillus niger</i>
α -amylase	Production de sirop riche en maltose	<i>Aspergillus niger</i>
Présure	Fromagerie	<i>Mucor miehe</i>
Pectinase	Industrie de boissons	<i>Aspergillus niger</i>
Invertase	Confiserie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Lactase	Laiterie	<i>Kluyveromyces</i>
Raffinase	Transformation industrielle	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Xylanase	Panification	<i>Aspergillus niger</i>

végétale est d'ailleurs particulièrement d'actualité avec de nombreuses études de production de biocarburants de seconde génération.

La production d'enzymes est modulée par des régulateurs transcriptionnels et dépend d'un ensemble de facteurs, comme la nature du champignon, la température, le pH, la présence de composés aromatiques, ... Il a été montré que certains gènes codant les CWDEs sont induits par plusieurs composés et d'autres par un composé spécifique. Selon la nature de la source de carbone présente dans le milieu de culture, les enzymes obtenues sont différentes. Pour le genre *Aspergillus*, près d'une trentaine vont ainsi être produites sur des sources de carbone mono- et polysaccharides [de Vries, 2003]. Une étude sur *F. graminearum*, en milieu minimum à base de parois végétales de houblon, a montré que ce champignon avait la capacité de produire trente xylanases [Hatsch et al., 2006], certaines d'entre elles fonctionnant

en synergie [Carapito et al., 2009]. D'autres activités enzymatiques ont pu être également observées dans le surnageant de culture [Phalip et al., 2009]. Par ailleurs, selon le mode de vie du champignon (nécotrophe, biotrophe ou symbiotique), la production de CWDEs est variable tant qualitativement que quantitativement. Ainsi on dénombre 33 enzymes pour *Ustilago maydis*, 138 pour *Magnaporthe grisea* [Kämper et al., 2006] deux champignons pathogènes, alors que chez *Aspergillus nidulans* qui est saprophyte, plus de 250 gènes codant les CWDEs sont présents dans le génome [Vorwerk et al., 2004].

Ces travaux démontrent bien la diversité des enzymes produites par les champignons, en leur conférant ainsi une grande capacité d'adaptation à l'environnement. Que l'on soit dans le cas d'interactions saprophytiques ou pathogènes, le besoin des champignons d'obtenir des sucres assimilables, à savoir des oligomères de tailles réduites, entraîne cette production d'enzymes. Ils montrent également la potentialité de l'importance de l'arsenal enzymatique déployé par le champignon lors d'une infection. La complexité de la paroi en terme de constituants amène ainsi les champignons à déployer des enzymes plus ou moins spécifiques de ces constituants. Dans le cas de la cellulose, celle-ci est dégradée par plusieurs enzymes, agissant en synergie, telles que des endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), des exo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.91) et des β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) [Niture and Pant, 2007]. Pour l'hémicellulose, la complexité de sa structure fait que sa dégradation nécessite plusieurs types d'endo- et d'exo-xylanase : β -1,4-endoxylanase et β -1,4-exoxylanase (EC 3.2.1.8). Enfin la dégradation de la pectine nécessite elle aussi la combinaison de plusieurs enzymes. Plus globalement, les CWDEs appartiennent aux familles suivantes, définies d'après la classification de la base de données CAZy (<http://www.cazy.org>) : les glycoside hydrolases (GH), les polysaccharide lyases (PL) et les carbohydre esterase (CE). Cette classification prend en compte la relation structure/fonction des enzymes [Henrissat, 1991]. Le numéro EC renvoie à une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction biochimique qu'elles catalysent.

1.2.2.2 CWDEs et interactions pathogènes

La rupture de la paroi végétale n'est pas toujours nécessaire à l'entrée d'un pathogène. Ce dernier peut s'introduire plus aisément via une blessure, des ouvertures naturelles (comme les stomates). Néanmoins beaucoup de pathogènes vont utiliser la force mécanique (via un appressorium, une structure mycélienne spécialisée qui ne sera pas abordée dans ce paragraphe) et/ou l'activité d'enzymes pour pénétrer la paroi végétale. C'est lors de cette étape, que les CWDEs vont intervenir.

La corrélation entre pathogénicité et l'activité des CWDE a été validée par l'étude de nombreux pathogènes fongiques : *Mycosphaerella graminicola* [Douaiher et al., 2007], *F. graminearum* [Kikot et al., 2009], *Verticillium dahliae* [Tzima et al., 2011], ... Certaines enzymes sont des facteurs de virulence. L'inactivation de gènes d'endopolygalacturonases a pu réduire la pathogénicité de *Claviceps purpurea* de plus de 98 % [D'Ovidio et al., 2004a]. L'utilisation de mutants dont certains gènes de CWDEs ont été délétés, n'a néanmoins pas toujours permis d'observer cette baisse de virulence [Akimitsu et al., 2004]. En effet, une enzyme peut être complétée par la sécrétion d'autres isoformes de cette enzyme avec une activité similaire.

La dégradation de la paroi nécessite pour le champignon d'activer une voie métabolique alternative à celle du glucose. En effet, la production de la plupart des CWDEs est soumise à une répression catabolique au niveau transcriptionnel de telle sorte que lorsque que le

glucose est disponible, les gènes codant les CWDEs, ainsi que d'autres gènes, ne sont pas ou peu exprimés. Plusieurs études ont pu mettre en évidence ces mécanismes sur différents champignons, avec par exemple l'importance de gènes codant des kinases (*VdSNF1* chez *Verticillium dahliae* ou son équivalent chez *U. maydis*) qui régule la répression catabolique [Jonkers and Rep, 2009, Nadal et al., 2010, Tzima et al., 2011].

On confère aux CWDEs plusieurs rôles dans la pathogénicité : pénétration à travers la paroi végétale, macération des tissus, acquisition de nutriments nécessaires à sa croissance, expression de symptômes et même paradoxalement induction des mécanismes de défense de la plante [Akimitsu et al., 2004].

1.2.3 Les mécanismes de défense de la plante

Bien que les interactions plantes/microorganismes soient fréquentes, il est rare que ces interactions aboutissent à une pathologie et à la mort de la plante [Hammond-Kosack and Kanyuka, 2007]. La plupart des plantes se défendent généralement efficacement contre les attaques déployées par les pathogènes. On peut distinguer trois types de relation entre une plante et un agent pathogène, comme décrit dans le tableau 1.6 (page 21) :

- la relation non-hôte-incompatible ;
- la relation hôte-incompatible ;
- la relation hôte-compatible.

La relation non-hôte-incompatible est un cas de résistance permanente spécifique. La plante va reconnaître des molécules provenant du pathogène qui seront considérées comme étant étrangères. Des mécanismes du système immunitaire de la plante seront activés. Les deux relations hôte-incompatible et hôte-compatible font appel au modèle « gène pour gène ». Ce modèle sous-entend que la résistance de la plante provient de la présence d'un gène de résistance (*R*) dominant couplé à un gène de virulence du pathogène (*Avr*). Une altération ou une perte du caractère d'un des gènes ($R \rightarrow r$ ou $Avr \rightarrow avr$) entraînera une réaction compatible, c'est-à-dire une maladie [Hammond-Kosack and Kanyuka, 2007].

Bien que les réactions de défense soient similaires, les mécanismes génétiques contrôlant les relations non-hôte incompatible et hôte incompatible sont différents.

Face aux attaques des CWDEs, la plante va ainsi mettre en place des mécanismes de défense. En plus d'être une barrière physique, la paroi végétale est un réservoir dynamique de protéines antimicrobiennes et de métabolites secondaires inhibant la croissance des pathogènes [Vorwerk et al., 2004]. La figure 1.12 (page 22) schématise les différentes étapes lors d'une interaction plantes/pathogènes.

Les mécanismes de défense se déroulent selon trois phases :

- la reconnaissance de l'hôte pathogène, appelé également la perception ;
- la signalisation correspondant à l'activation d'une cascade de signaux en local mais aussi dans la plante entière ;
- l'expression des réactions de défense.

Tableau 1.6 – Les différents types de réaction de pathogénicité.

Type d'interactions	Non-hôte	Hôte	
		Incompatible	Compatible
Etat de la plante	Immunisée	Résistante	Sensible
Pathogènes	Détection des PAMPs ^a . → Avirulence	Reconnaissance des effecteurs <i>Avr</i> . → Avirulence	Les effecteurs et les toxines interagissent avec des cibles spécifiques de la plante. → Virulence
Défenses de la plante	Activation des défenses immunitaires innées	Défenses basales, cascades de signaux	Uniquement des défenses de base
Résultat	Pas de maladie, incompatibilité.	Symptômes absents ou faibles.	Maladie. Progapation et dissémination du pathogène.

a. PAMPs : *Pathogen-associated Molecular Patterns*

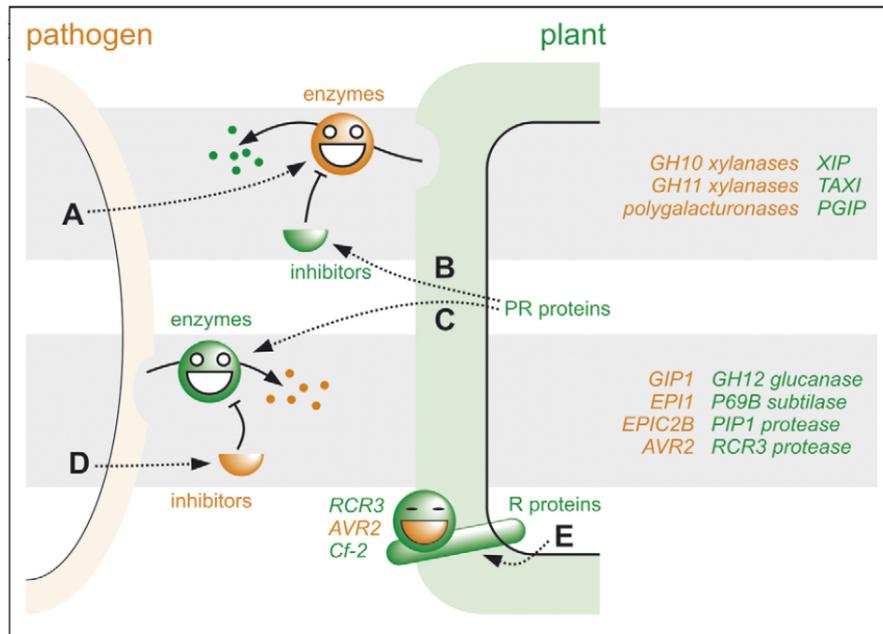


Figure 1.12 – Schéma des interactions plantes/pathogènes. Les couleurs orange et verte représentent des éléments correspondant respectivement au pathogène et à la plante.

- A** : Le microorganisme utilise des CWDEs (GH10, GH11 xylanases, ...) et d'autres hydrolases touchant directement la paroi végétale.
- B** : En réponse à cette attaque, la plante sécrète des inhibiteurs (XIP, TAXI, ...) qui vont réprimer ces hydrolases
- C** : et, en parallèle, des PR-protéines (*Pathogenesis-related*) sont sécrétées.
- D** : En réponse à cette contre-attaque, le pathogène produit à son tour des inhibiteurs afin de réprimer les enzymes de la plante.
- E** : Enfin la dernière étape consiste en un système de reconnaissance impliquant les gènes de résistance (R) induisant d'autres défenses de la plante, dont la mort cellulaire.

Abbreviations : XIP : *Xylanase-Inhibitor Protein* ; TAXI : *Triticum aestivum Xylanase-Inhibitor* ; PGIP : *PolyGalacturase Inhibitor Protein* ; PR : *Pathogenesis-related* ; GIP : *Glucanase Inhibitor Protein* ; GH12 : *Glycosyl Hydrolase 12* ; EPI1 : *extracellular protease inhibitor* ; P69B : *Subtilisin-like protease* ; EPIC2B : *P. infestans cysteine protease inhibitor* ; PIP1 : *Phytophthora-inhibited protease-1* ; AVR2 : *avirulence protein 2* ; RCR3 : *required for Cladosporium resistance-3*.

1.2.3.1 Perception et signalisation

La plante reconnaît l'attaque d'un pathogène soit directement par des molécules associées aux pathogènes appelées PAMPs (Pathogen-associated Molecular Pattern) ou indirectement, par des fragments générés par l'attaque de la plante contre le pathogène, comme des oligomères de chitine [Hématy et al., 2009].

La production des CWDEs par les pathogènes va conduire à la libération d'oligosaccharides qui peuvent être considérés comme des PAMPs également appelés éliciteurs. On appelle éliciteur un composé endo- ou exogène qui induit une réaction de défense chez la plante [Vorwerk et al., 2004]. Ainsi la dégradation des composés d'homogalacturonique de la pectine par la β -1,4-glucanase va générer des acides oligogalacturoniques (OGAs), très bien caractérisés en tant qu'éliciteurs. La reconnaissance des OGAs par la plante induit un changement d'expression de gènes, la production de protéines de défense et l'induction des voies métaboliques de l'éthylène et de l'acide jasmonique [Vorwerk et al., 2004, Hématy et al., 2009].

Dans certain cas, il s'agit non pas du ou des produits enzymatiques qui seront reconnus, mais l'enzyme en tant que telle. Ainsi la xylanase Eix (ethylene-inducing xylanase) produite par *Trichoderma viride* est reconnue par deux gènes de résistances de la tomate et les récepteurs correspondants (des protéines riches en résidus Leucine : LRR-RLPs). Cette reconnaissance va induire la synthèse d'éthylène, l'alcalinisation du milieu, l'expression de PR-protéines et la réaction hypersensible de la plante [Bar et al., 2010].

D'autres protéines, sans caractère enzymatique, produites par les pathogènes ont également cette capacité à induire des phénomènes de résistance de la plante. Il s'agit par exemple des CBELs (*cellulose binding elicitor lectin*) de *Phytophthora parasitica* faisant partie des protéines identifiées lors de la germination des spores et la formation d'un appressorium [Grenville-Briggs et al., 2010].

Bien que le mécanisme ne soit pour l'instant pas encore connu, il semblerait que l'inhibition de la synthèse de la cellulose (par exemple par des toxiques microbiennes) serait également reconnue et induirait une réponse de défense ainsi l'augmentation de la résistance de l'hôte [Hématy et al., 2009].

1.2.3.2 Réactions de défense

La perception de l'attaque va activer une variété de défenses tout en préparant les prochaines contre-attaques :

- la fortification de la paroi végétale ;
- le stress oxydatif ;
- la production de composés antimicrobiens ;
- la sécrétion d'hormones de défense telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique ou l'éthylène.

Face à l'attaque du pathogène, la plante va mettre en place des mécanismes pour la consolidation de la paroi. Le dépôt de callose est celui le plus couramment observé. Formant une papille, il correspond à une accumulation dans la cellule, face à l'hyphe pénétrant, de substances constitutives de la paroi, essentiellement de la callose (β -1,3 glucane) et de la cellulose. C'est la rapidité de l'action (6h par exemple après l'inoculation de *Fusarium*

oxysporum chez la tomate) et non la quantité de callose qui fera de cette réaction, une réponse efficace ou non [Corbaz, 1990]. Ce mécanisme va entraîner l'activation des voies métaboliques de l'éthylène, de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique [Hématy et al., 2009]. Plus tardivement, apparaît des mécanismes de lignification (ajout de lignine ou d'extensines). Les parois auront ainsi une plus grande résistance à la pression mécanique, seront moins sensibles aux enzymes fongiques et la croissance mycélienne en sera limitée [Corbaz, 1990].

L'inactivation des armes fongiques sera également une des réactions de défense de la plante. Les pectines, les polygalacturonases produites par le champignon peuvent être contrées par des inhibiteurs appelés PGIPs (*polygalacturonase-inhibitor proteins*). D'autres inhibiteurs peuvent être produits selon les différentes couches histologiques dégradées par les CWDEs et font l'objet d'une partie suivante (Section 1.3, page 27). On peut néanmoins préciser que ces protéines auront deux rôles ; le premier étant de minimiser les dégâts causés à la paroi végétale, le second, de maximiser la production d'éliciteurs dérivés de la paroi végétale comme les OGAs [Hématy et al., 2009].

La défense de la plante proprement dite passe par la synthèse protéique de phytoalexines et/ou de PR-protéines. Longtemps considérées comme le mécanisme clé de la résistance de la plante, les phytoalexines sont des composés antimicrobiens produits par la plante pour se défendre contre les pathogènes. Elles interviennent soit suite à une infection soit en réponse à des éliciteurs [Dyakov et al., 2007]. Les PR-protéines sont un groupe de protéines absentes ou en faible quantité en temps normal, mais produites par la plante en réponse à une infection, des composés chimiques ou d'un stress abiotique. Elles sont réparties en différents groupes, au nombre de 17, selon leur poids moléculaire, leur similarité en séquence nucléotidique ou leur activité biologique [Sels et al., 2008]. Les PR-protéines de type 2 sont des β -1,3-glucanases, qui ont la capacité de dégrader la paroi des champignons et jouent également le rôle d'éliciteurs. L'action conjuguée de ce groupe de PR-protéines avec ceux de type 3, des chitinases, est une réponse efficace pour inhiber la croissance du pathogène et le déclenchement de la résistance de la plante [Dyakov et al., 2007]. Les défensines, PR-protéines de type 12, sont des petites molécules (environ 5kDa), riches en cystéines ayant des activités antifongiques, antibactériennes et inhibitrices de protéases [Stotz et al., 2009]. Certaines de ces PR-protéines sont des hydrolases ; la libération des fragments de la paroi des pathogènes déclenche une réponse PAMP, et renforce les résistances de l'hôte [Hématy et al., 2009]. Bien que toutes les PR-protéines n'aient pas montré des effets répressifs envers les pathogènes, un certain nombre d'entre elles apparaissent comme faisant partie d'un ensemble plus important de réactions de défenses, dépendant de l'éthylène, de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique, dans lequel chaque composé pourrait participer à la résistance de la plante [Sels et al., 2008].

D'autres mécanismes de défense entrent en jeu, comme le stress oxydatif (ROS : *Reactive Oxygen Species*). Il s'agit de la production rapide de formes réactives de l'oxygène tels que les anions superoxydes O_2^- , très instables formant rapidement du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Cette activation est une des premières réponses de la plante et joue un rôle central dans l'expression de l'hypersensibilité [Dyakov et al., 2007]. Cette dernière, également appelée réaction hypersensible (HR), intervient lors de réactions incompatibles avec le pathogène. Ce mécanisme de défense va entraîner une modification de la paroi par l'accumulation de PR protéines (chitinase, gluconase), de phytoalexines ainsi que des composés phénoliques. La concentration en ROS est proportionnelle à l'intensité du stress (Figure 1.13, page 25) et peut conduire à la mort des cellules infectées ainsi qu'à l'accumulation de composés toxiques. Cette zone devient une zone de résistance locale acquise, puis induit un phénomène de résistance

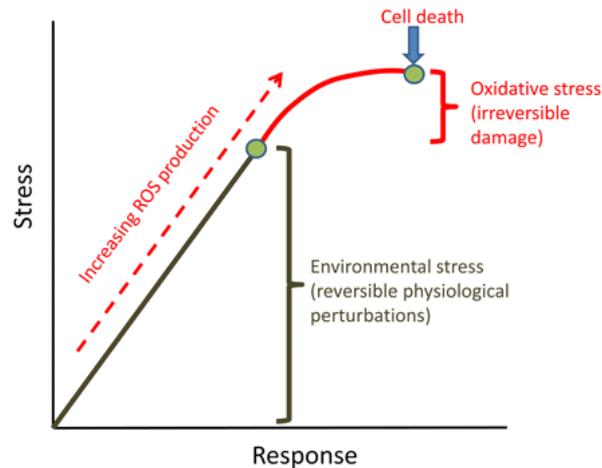


Figure 1.13 – Production de ROS par la plante lors d'un stress.

systémique acquise (SAR : *Systemic Acquired Resistance*). Par analogie avec l'immunisation chez les mammifères, ce mécanisme va permettre à la plante de se défendre plus efficacement lors d'une prochaine attaque. Cette défense ne sera d'ailleurs pas spécifique aux pathogènes responsables de cette infection, mais protège la plante contre un large spectre de pathogènes [Ferreira et al., 2007]. La SAR est associée à l'induction de gènes codant les PR-protéines et son activation est liée à l'accumulation d'acide salicylique, montrant une fois de plus l'omniprésence des phytohormones et leur importance aux différentes étapes de défense.

Il a été montré que les attaques de pathogènes sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* impliquaient des voies métaboliques dépendantes de l'acide salicylique, alors qu'elles sont acide jasmonique-dépendantes dans le cas d'attaque par des insectes broyeurs ou des microorganismes saphrophites. Par ailleurs, ces deux hormones interagissent fréquemment soit de manière antagoniste soit synergique, selon leurs concentrations [Gutjahr and Paszkowski, 2009]. L'ensemble de ces réactions sont complexes et mettent en place un nombre important de mécanismes et de cascades de signaux. La figure 1.14 (page 26) permet d'illustrer la complexité des voies métaboliques et de représenter certains points abordés précédemment.

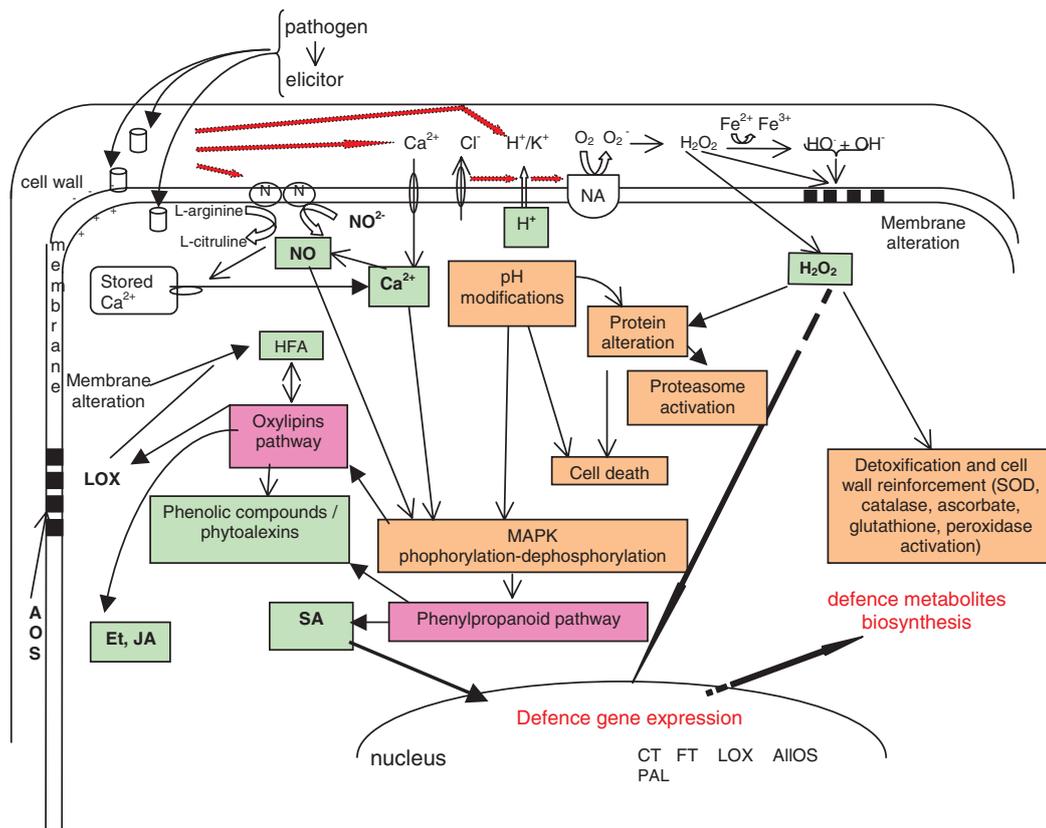


Figure 1.14 – Schématisation des réactions de défense induites lors d'une interaction plante/pathogène.

La reconnaissance des éliciteurs entraîne chez la plante la production de molécules signal (encadrés **vert**) qui vont soit activer des voies métaboliques de défenses biochimiques (encadrés **rose**) soit affecter directement le mécanismes cellulaires (encadrés **marron**).

Abbreviations : NO : *nitric oxide* ; HFA : *hydroxy fatty acid* ; SA : *salicylic acid* ; CT : *coumaroyl tyramine* ; FT : *feruloyl tyramine* ; LOX : *lipoxygenase* ; AIOS : *allene oxide synthase* ; Et : *ethylene* ; P : *perception* ; PAL : *phenylalanine ammonia lyase* ; MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*.

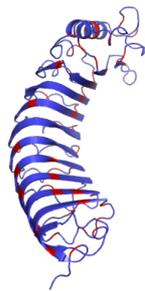
1.3 Les inhibiteurs de CWDEs

La première ligne de défense face à l'attaque des CWDEs est l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Plusieurs groupes d'inhibiteurs vont intervenir selon la couche de la paroi dégradée :

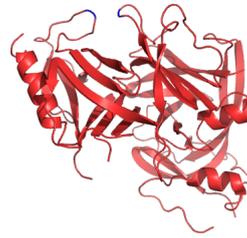
- lors de la dégradation de la pectine : principalement les PGIPs, ainsi que d'autres inhibiteurs liés aux enzymes de dégradation de la pectine.
- lors de la dégradation de l'hémicellulose :
 - ⇒ dans le cas des monocotylédones :
 - les TAXIs : *Triticum aestivum xylanase-inhibitors*,
 - les XIPs : *xylanase-inhibitor proteins*,
 - les TLXIs : *thaumatin-like xylanase inhibitors*,
 - ⇒ dans le cas des dicotylédones :
 - les XEGIPs : *xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor proteins*.

Ces différents inhibiteurs sont représentés en structure tridimensionnelle à la figure 1.15 (page 28), à l'exception des protéines de type XEGIP dont aucune structure n'est connue.

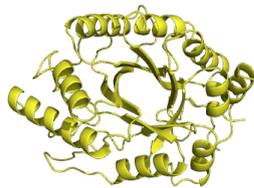
L'origine de ces inhibiteurs, leurs spécificités, leurs implications dans la défense de la plante seront abordés lors de cette partie, avec une attention particulière pour les XEGIPs qui sont au centre de ce projet.



(a) Structure moléculaire d'une PGIP de *Phaseolus vulgaris* [Di Matteo et al., 2003]. En rouge apparaissent les résidus leucines de cette structure.



(b) Structure moléculaire d'un TAXI de *Triticum aestivum* [Sansen et al., 2004]. Les résidus importants dans le processus d'inhibition apparaissent en bleu.



(c) Structure moléculaire d'une XIP de *Triticum aestivum* [Payan et al., 2003].



(d) Structure moléculaire d'une TLXI de *Triticum aestivum* [Vandermarliere et al., 2010].

Figure 1.15 – Structures moléculaires d'inhibiteurs de CWDEs.

1.3.1 Les protéines inhibitrices des polygalacturonases

Parmi les CWDEs produites par les pathogènes, les *endopolygalacturonases* sont produites très tôt après l'infection [D'Ovidio et al., 2004a]. Il peut s'agir de polygalacturonases (PGs de la classe des GH28 hydrolysant l'homogalacturonane), de pectate lyases, de pectine lyases ou encore de pectine méthylestérases [Lagaert et al., 2009]. L'activité de ces enzymes peut être diminuée par la sécrétion par la plante d'inhibiteurs. Ainsi les PGIPs, dirigées contre les PGs, sont des éléments importants des mécanismes de défense de la plante contre les pathogènes fongiques. Ces protéines extracellulaires sont exprimées lors de stress abiotiques, de blessures et des nombreuses preuves font mention de leur rôle lors d'attaques fongiques [Protsenko et al., 2008, Lagaert et al., 2009]. La capacité des PGs à hydrolyser la fraction pectine de la paroi végétale est réduite et la génération d'éliciteurs tels que des oligogalacturonides est favorisée. Globalement, l'invasion fongique est limitée.

Ces inhibiteurs sont largement représentés dans le règne végétal [Misas-Villamil and van der Hoorn, 2008] et il existe de nombreux isoformes, présentant des cibles spécifiques différentes. Les PGIPs, de poids moléculaires d'environ 20 kDa, appartiennent à la superfamille des protéines riches en répétition leucine (LRR), région connue pour être spécialisée dans les interactions protéines/protéines. La structure des PGIPs présente une surface chargée négativement sur la face concave de ces résidus LRRs [Lagaert et al., 2009] (Figure 1.15a, page 28) qui joue un rôle certain dans les phénomènes d'inhibition. Les mécanismes sont différents selon l'inhibiteur et l'enzyme cible, avec des cas d'inhibitions compétitives, partiellement ou encore non-compétitives. Les PGIPs sont d'ailleurs incapables d'inhiber les PGs d'origine bactérienne ou florale [Lagaert et al., 2009].

1.3.2 Les inhibiteurs de xylanases

Les endoxylanases, sont des glycosyles hydrolases (GH) avec une activité spécifique vis-à-vis du xylane. La classification CAZy les décrit comme faisant partie des familles GH5, 7, 8, 10, 11 et 43, ayant montré une activité endo- β -1,4-xylanase. Les GH10 et GH11 sont parmi les plus représentées. À l'heure actuelle, trois classes de protéines inhibitrices d'endoxylanase et avec des structures différentes, ont été identifiées chez les plantes monocotylédones de la famille des graminées : les TAXIs, les XIPs et les TLXIs. Plusieurs récentes publications documentent ces protéines ayant un effet inhibiteur sur les GH10 et GH11 [Lagaert et al., 2009, Dornez et al., 2010, Gusakov, 2010]. Les preuves du rôle des inhibiteurs de xylanases dans la défense de la plante sont bien établies, les XIPs et les TLXIs faisant d'ailleurs partie des PR-protéines.

1.3.2.1 *Triticum aestivum xylanase-inhibitor*

C'est dans un contexte industriel, que les inhibiteurs de xylanases ont été identifiés [Debyser et al., 1997], en premier lieu chez le blé, puis chez d'autres graminées : orge, riz, maïs, ... D'une masse de l'ordre de 40 kDa, les inhibiteurs de type TAXI présentent deux formes moléculaires, dites A et B, la seconde forme correspondant au produit d'une hydrolyse partielle de la forme A. Les protéines TAXI présentent des isoformes, TAXI-I et TAXI-II, ayant des pI et des spécificités d'action différentes. Des gènes codant ces deux isoformes ont également été trouvés chez l'orge (*Hordeum vulgare*) et le riz (*Oryza sativa*). Il est également fait référence aux formes dites TAXI-III et TAXI-IV mais la similarité presque parfaite de

ces séquences avec TAXI-IB et TAXI-IIB (99,6 % and 99,8 %), amènent à penser qu'il s'agit d'isoformes de TAXI-IB et TAXI-IIB [Gusakov, 2010]. Les inhibiteurs de type TAXI ont une action d'inhibition spécifiquement dirigée vers les GH11 d'origine bactérienne ou fongique et sont inactifs contre les GH10. Des spécificités d'inhibition apparaissent au sein de cette famille avec une capacité de TAXI-I à inhiber les xylanases d'*Aspergillus niger* et de *Bacillus*, alors que TAXI-II n'est active uniquement sur les enzymes bactériennes [Gusakov, 2010]. La structure tridimensionnelle de TAXI-I en complexe avec une GH11 a été déterminée et le mécanisme est à l'heure actuelle bien déterminée. On peut noter l'importance de la région C-terminale sur les différences de spécificité inhibition entre les TAXI-II et les autres protéines de type TAXI [Lagaert et al., 2009].

L'induction des *Taxi* est variable selon l'isoforme, selon le pathogène, le traitement (blessure, acide jasmonique), selon les tissus analysés, lors des différents stages de germination [Dornez et al., 2010].

1.3.2.2 *Xylanase-inhibitor protein*

Les XIPs diffèrent des TAXIs par une structure et des propriétés différentes. Ce sont des protéines de 30 kDa dont les séquences d'acides aminés présentent des homologies avec les chitinases de plante de classe III (Figure 1.15c, page 28) [McLauchlan et al., 1999]. Aucune activité de ce type n'a pourtant été démontrée, du fait de la présence de liaisons non-covalentes et de liaisons hydrogène fortes en occultant le site actif responsable de l'activité chitinase [Gusakov, 2010]. Tout comme les inhibiteurs de type TAXI, les XIPs semblent être organisés sous forme de familles multigéniques, avec la présence de plusieurs gènes différents (*Xip-I*, *Xip-II*, *Xip-III*, *Xip-R*).

Ces gènes, tout comme ceux des TAXIs, sont induits différemment selon les conditions. *Xip-I* est par exemple pathogène-inductible et son expression dépend du type de pathogène et/ou du tissu infecté [Lagaert et al., 2009]. Les XIPs ont la particularité de présenter deux sites indépendants de fixation d'enzymes, leur permettant ainsi d'inhiber aussi bien les GH10 que les GH11, mais uniquement celles d'origine fongique et non les bactériennes [Juge et al., 2004].

1.3.2.3 *Thaumatin-like xylanase inhibitor*

Les TLXIs sont les derniers types d'inhibiteurs de xylanases découverts chez les monocotylédones [Fierens et al., 2007]. Ces protéines sont composées d'une simple chaîne d'acides aminés et d'un poids moléculaire de 18kDa (Figure 1.15d, page 28). Leur séquence montre de fortes similarités avec des protéines du type thaumatine, qui possèdent des propriétés antifongiques et font partie des PR-protéines de classe 5. Elles ont d'ailleurs la particularité d'être stables à de fortes températures ou à des pH élevés. Leur activité est similaire à celle des TAXIs, agissant uniquement sur les enzymes de la famille des GH11. Leur mécanisme d'inhibition diffère néanmoins, avec une inhibition de type non-compétitive.

1.3.3 Les protéines inhibitrices de xyloglucanases

Le xyloglucane peut être hydrolysé par certaines endoglucanases et plus précisément par une classe d'enzymes nommée les XEGs : *xyloglucan-specific endoglucanases*, EC 3.2.1.151 [Grishutin et al., 2004]. Ces protéines appartiennent aux enzymes de la famille des GH5, 12, 16, 26, 44 et 74 d'après la classification de CAZy. Le terme XEGIP est apparu pour la première fois en 2003 lors de l'étude d'une protéine de la tomate [Qin et al., 2003]. Outre cet inhibiteur, deux XEGIPs ont été purifiées et leur fonction confirmée : la XEGIP du tabac ornamental Nectarin IV, nommée NEC4 [Naqvi et al., 2005] et la XEGIP de la carotte, nommée EDGP (*extracellular dermal glycoprotein*) [Shang et al., 2004]. Ces protéines ont la capacité d'inhiber les enzymes de la famille des XEGs d'origines fongiques, de la famille des GH12. Elles sont par contre inactives vis-à-vis des XEGs de plantes [York et al., 2004]. Récemment, la conglutine- γ du lupin a fait l'objet d'une étude et pourrait, du fait de similarités avec d'autres XEGIPs, s'apparenter à une XEGIP [Scarafoni et al., 2010]. Néanmoins, à l'heure actuelle, sa propriété inhibitrice n'a pas pu être vérifiée.

De nombreux gènes putatifs codant des XEGIPs sont présents chez plusieurs plantes : soja, lotus, maïs, coton, riz, sorgho [York et al., 2004]. Les alignements de séquences avec les inhibiteurs de type TAXI et la conservation des cystéines suggèrent des similarités structurales, notamment au niveau du centre actif [York et al., 2004]. Néanmoins, le nombre d'études portant sur ce type d'inhibiteur est faible et les preuves du rôle biologique dans la défense de la plante peu renseignées.

Ces inhibiteurs étant l'objet de ce projet de recherche, une caractérisation plus approfondie sera apportée dans la suite du manuscrit.

CONTEXTE ET OBJECTIF DU PROJET DE RECHERCHE

Le laboratoire d'enzymologie des interactions plantes / champignons (ESBS, Université de Strasbourg, Illkirch) est depuis de nombreuses années impliqué dans les problématiques des planteurs de houblon d'Alsace. Une des missions consiste au suivi de la charge fongique et à la caractérisation de ces agresseurs par prélèvements en parcelles et par des plants de houblon en importation. Les études ont permis de mettre en évidence la présence de champignons spécifiques aux houblonnières alsaciennes, comme mentionné dans la section 1.1.5.2.4 (page 12).

Des travaux de création variétale composent la deuxième section des investigations. Ce programme à dimension européenne d'une durée de 10 ans et prenant fin en 2011 est basé sur les approches de diversité génétique des plantes parentales et a pour but la création de nouvelles variétés de houblon (comme en mars 2011, la variété : ARAMIS).

Les études génomiques du houblon effectuées au laboratoire ont conduit à l'obtention d'une EST (*expressed sequence tag*) ayant des similarités avec le domaine « Xylanase Inhibitor ». Ces protéines auraient un lien avec les réactions de défense de la plante face à un pathogène. Leur présence chez le houblon pourrait ainsi permettre de mettre en évidence pour la première fois ces protéines chez cette plante et les caractériser. Leur étude aurait pour but d'appréhender les interactions entre cette plante et le pathogène fongique, mais également, à terme, de définir des moyens de lutte contre ces infections. On parle ici de stimulation des défenses naturelles et de phytoprotection en reproduisant de manière synthétique ces inhibiteurs.

Nous avons dans un premier temps identifié des gènes codant des XEGIPs chez le houblon (Chapitre 2), qui ont conduit à la production hétérologue de ces protéines (Chapitre 3). Afin de valider la fonction de ces inhibiteurs, des tests d'activités ont été mis en place et seront présentés en chapitre 4. Enfin nous avons étudié l'expression des gènes codant les XEGIPs dans la plante (Chapitre 5).

CARACTÉRISATION DE TROIS INHIBITEURS DE XYLOGLUCANASE CHEZ LE HOUBLON

Sommaire

2.1	Introduction	37
2.2	Matériel et Méthodes	38
2.2.1	Matériel biologique	38
2.2.1.1	Plants de houblon	38
2.2.1.2	Microorganismes	38
2.2.2	Outils et techniques de biologie moléculaire	38
2.2.2.1	Séquence EST initiale	38
2.2.2.2	Extraction d'ADN plasmidique et d'ARN	38
2.2.2.3	Synthèse d'ADNc et Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	38
2.2.2.4	Amplification d'acides nucléiques et clonage	39
2.2.3	Bioinformatique	40
2.2.3.1	Analyse des séquences	40
2.2.3.2	Prédiction de la séquence signal et de la localisation	41
2.2.3.3	Prédiction des ponts disulfures et des sites de glycosylation	41
2.2.3.4	Analyses phylogénétiques	41
2.3	Résultats	42
2.3.1	EST codant un fragment d'inhibiteur de xyloglucanase	42
2.3.2	Obtention de trois gènes codant des XEGIPs	43
2.3.2.1	Identification d'un gène codant une XEGIP chez le plant mâle	43
2.3.2.2	Identification de gènes codant des XEGIPs chez le plant femelle	47
2.3.3	Caractérisation des trois XEGIPs	51
2.3.3.1	Données générales	51
2.3.3.2	Homologie dans les bases de données	53
2.3.3.3	Occurrence	56
2.3.3.4	Variations génétiques	57
2.3.3.5	Distribution spatiale	57
2.4	Discussion	58

2.1 Introduction

Il y a environ 10 ans, l'existence d'inhibiteurs de xylanases présents chez diverses céréales (blé, orge, riz) a été découverte. Leur présence pouvait affecter la fonctionnalité des enzymes microbiennes couramment utilisées en industrie et notamment dans les processus de fabrication du pain [Debyser et al., 1999]. Depuis, les inhibiteurs de xylanases de type TAXI, XIP ou encore TLXI ont été abondamment étudiés chez les monocotylédones : études protéines, mécanismes d'inhibition, études du rôle de ces protéines chez les plantes, détermination des structures cristallines, ... L'étude des XEGIPs est quant à elle bien moins poussée, malgré une présence démontrée dans de nombreuses plantes [Sato et al., 1992, Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005].

La mise en évidence d'une EST chez le houblon ayant des similarités avec le domaine « *xylanase-inhibitor* » a conduit notre équipe à travailler sur cette thématique. Les analyses en bioinformatique montrent l'appartenance de ce gène à ceux des XEGIPs et révèlent ainsi pour la première fois la présence de ces inhibiteurs chez le houblon. À partir de cette EST, la séquence nucléotidique a été déterminée permettant ainsi de caractériser la protéine codant pour ce gène.

2.2 Matériel et Méthodes

2.2.1 Matériel biologique

2.2.1.1 Plants de houblon

Les plants étudiés sont des plants de houblon femelles de la variété Strisselspalt (CO-PHOUDAL, Obernai, prélèvement du 03/07/07) et des plants mâles sauvages (bord de la Bruche, Molsheim, prélèvements du 20/07/07).

2.2.1.2 Microorganismes

La souche d'*E. coli* utilisée pour les travaux de ce chapitre est la souche TOP10 avec le vecteur pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen).

2.2.2 Outils et techniques de biologie moléculaire

2.2.2.1 Séquence EST initiale

La séquence EST initiale a été obtenue à partir de banques d'ADNc préalablement construites au laboratoire. Elle est enregistrée sous le numéro d'accèsion CO653571.1, sous l'appellation « HIF HSS cDNA Humulus lupulus cDNA clone 083f12 similar to AAP84703.1 | putative xyloglucanase inhibitor [Solanum tuberosum] | e-value⁴ : 9e-28, mRNA sequence ».

2.2.2.2 Extraction d'ADN plasmidique et d'ARN

Les extractions d'ADN et d'ARN des extraits végétaux de houblon (à partir de 100-150 mg et 250 mg) ont été respectivement réalisées grâce aux kits NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel) et RNAqueous -4PCR[®] + Plant RNA Isolation Aid (Ambion). Les extractions d'ADN plasmidiques sont réalisées par le kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel).

2.2.2.3 Synthèse d'ADNc et Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Les RACEs en 3' et 5' ont été effectuées selon le protocole du kit BD SMART[™]RACE cDNA Amplification (BD Biosciences). La synthèse de l'ADNc est effectuée selon ce même protocole, à partir de 250 mg de houblon.

4. Probabilité de trouver le même résultat par hasard

2.2.2.4 Amplification d'acides nucléiques et clonage

Les PCRs sur les ADNc issus de la RACE en 3' et en 5' sont effectués selon le protocole du kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification avec les amorces présentées dans le tableau 2.1 (page 39). Les amorces Rinhx7 et RevRinhx7 sont définies sur la séquence de l'EST et ont servi avec les amorces universelles (UPM : *Universal Primer Mix* et NUP : *Nested Universal Primer*) à la détermination des séquences en 3' et 5'.

Tableau 2.1 – Amorces utilisées lors du chapitre 2 dans le cadre des travaux de RACE.

Désignation	Séquence 5' → 3'	Utilisation
UPM	ctaatacgcactcactatagggcaagcagtggtatcaacgcagagt	5' et 3' RACE
NUP	aagcagtggtatcaacgcagagt	5' et 3' RACE
Rinhx7	caccgtcaacgaatccaaggcac	5' RACE
RevRinhx7	gtgccttgattcggtgacggtg	3' RACE
Rinhx24	gcctttcgagctatgcttcaactc	3' RACE
Rinhx26	gcctttgtaatgcgcttgctgctc	3' RACE
inhx10	gcaggtgtcctcaatttgatgcc	PCR sur colonies
inhx2b	ctcagatcgatttggtgtgccga	PCR sur colonies

Dans le cadre de la caractérisation des inhibiteurs chez d'autres plantes, des PCRs complémentaires ont été effectuées. Le tableau 2.2 (page 39) décrit les amorces utilisées.

Tableau 2.2 – Amorces supplémentaires utilisées lors du chapitre 2.

Désignation	Séquence des amorces 5' → 3'	Gène cible	Taille de l'amplicon
Inh1f Inh1R	ctagaagcctcgatcca gccaagagctttga	Inhibiteur n° 1	228 pb
Inh2f Inh2R	aggctgcaacaacaaca tgctctcgtcgaaga	Inhibiteur n° 2	308 pb
Inh3f Inh3R	gtgtcggtgaatagetca gtcacggttacggaca	Inhibiteur n° 3	153 pb
Inh123 f Inh123 R	aggtgtgtgccttgga gaggagctgaaaccaag	Les trois inhibiteurs	≈ 150 pb

Les produits de PCR obtenus à l'issue des RACEs en 3' et en 5' sont dans un premier temps déposés sur gel d'agarose 1 % contenant du BET (bromure d'éthidium), puis purifiés sur gel avec le kit Nucleospin Extract II (Macherey Nagel).

Les clonages sont effectués avec le kit TOPO TA Cloning® Kit for sequencing (Invitrogen). La première étape consiste en l'ajout d'une queue poly-A, selon le protocole suivant :

- 0,5 U de Taq polymérase (TAQ POL, Euromedex)
- 1X de PCR bufferB
- 2 mM de MgCl₂ } Incubation 12 minutes à 72 °C.
- 200 μM d'ATP
- 200 ng de produit de PCR purifié

La ligation se déroule selon le protocole du kit TOPO TA Cloning® et l'insert est placé dans le vecteur par choc thermique :

- 20 min dans la glace,
- 30 s à 42 °C,
- ajout de 250 μl de LB } incubation 1 heure à température ambiante.
(Luria Bertani, Sigma).

Plusieurs volumes de la suspension sont étalés sur boîte LB + kanamycine (30 μg/μl) et incubés 16 h à 37 °C.

La présence de l'insert est testée sur les clones par PCR sur colonies avec les jeux d'amorces RevRinhx7-inhx10 et Rinhx7-inhx2b, respectivement pour les PCRs issues de l'ADNc en RACE 3' et de celui en RACE 5' (Tableau 2.1, page 39).

PCR sur colonies :

- 1 X de PCR bufferB
- 2 mM de MgCl₂
- 0,5 μM de dNTPs
- 0,5 μM de chaque amorce
- 10 μl de surnageant de colonies dissociées
- H₂O qsp 50 μl

Cycle de la PCR sur colonies :

- 5 min à 95 °C
- 1 min à 95 °C
- 1 min à 58 °C } 35 cycles
- 1 min à 72 °C
- 10 min à 72 °C

Les clones choisis sont mis en culture en vue d'une extraction d'ADN plasmidique et d'un séquençage (plate-forme de séquençage de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France)).

2.2.3 Bioinformatique

2.2.3.1 Analyse des séquences

Les recherches d'homologie sont effectuées par comparaison des séquences avec les bases de données par le programme BLAST [Altschul et al., 1997], via la plate-forme du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les alignements de séquences ont été réalisés à partir du programme Clustal avec l'utilisation de la matrice de score CLUSTALW pour les alignements nucléotidiques ou BLOSUM (Blocks Substitution Matrix) dans le cas d'alignements protéiques. La représentation des séquences est effectuée avec `TeXshade` [Beitz, 2000].

2.2.3.2 Prédiction de la séquence signal et de la localisation

La prédiction de la séquence signal de la protéine a été réalisée à partir du programme iPSORT [Bannai, 2010]. La localisation prédite de la protéine a conduit à l'utilisation du programme Plant-mPLoc [Chou et al., 2010].

2.2.3.3 Prédiction des ponts disulfures et des sites de glycosylation

La prédiction des ponts disulfures est effectuée par le programme DiANNA [Ferre and Clote, 2005]. Les sites de N- et O-glycosylation ont été prédits par le serveur EnsembleGly [Caragea et al., 2007].

2.2.3.4 Analyses phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques ont été générés par l'utilisation de la plateforme internet *phylogeny.fr* [Dereeper et al., 2008]. Les séquences sont dans un premier temps alignées par ClustalW, puis subissent une modification visant à supprimer les alignements dits pauvres et les régions divergentes. Les arbres sont créés à l'aide du programme PhyML [Guindon and Gascuel, 2003] selon la méthode de maximum de vraisemblance (*maximum likelihood*) puis visualisés avec le logiciel FigTree.

2.3 Résultats

2.3.1 EST codant un fragment d'inhibiteur de xyloglucanase

La séquence EST initiale, issue d'une banque du laboratoire, est composée de 422 bp (Figure 2.1, page 42). La position des codons STOP ainsi qu'un alignement par un BLASTx [Altschul et al., 1997] permet de déterminer que le cadre de lecture le plus probable est un cadre de lecture +2. En effet, l'alignement par un BLASTx met en évidence, selon ce cadre de lecture, de fortes similarités avec des inhibiteurs de xyloglucanase, appartenant à des dicotylédones de la famille des solanacées (Tableau 2.3, page 43) (n'ont pas été prises en compte les protéines ayant l'appellation « putatives » ou « predicted »). De fortes similarités sont observées avec des protéines de plantes dicotylédones : le ricin, le riz, le peuplier, le soja, la carotte, le lupin, *A. thaliana*, *Medicago truncatula*, laissant présager que les XEGIPs sont bien représentées. Les pourcentages d'identité sont en effet compris entre 68 et 73 %. Selon ce cadre de lecture, une séquence protéique de 96 acides aminés a pu être déterminée.

Il est intéressant de remarquer la présence d'une similarité avec des inhibiteurs de type TAXI bien caractérisés. Le pourcentage d'identité est de 53 % avec la protéine ACG48847 : xylanase inhibitor TAXI-IV, *Zea mays*. Ceci renforce l'hypothèse qu'une partie de l'EST est incluse dans un gène codant des inhibiteurs d'enzymes. La séquence protéique traduite de l'EST est située dans la région C-terminale de la protéine.



Figure 2.1 – Séquence de l'EST.

Tableau 2.3 – BLASTx à partir de la séquence initiale de l'EST.

Numéro d'accension	Désignation	Plante	Pourcentage d'identité
ACM68431	Xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor protein	<i>Capsicum annuum</i>	71 %
AAX81588	Nectarin IV	<i>Nicotiana langsdorffii</i> <i>x Nicotiana sanderae</i>	73 %
AA97864	Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor	<i>Solanum lycopersicum</i>	71 %
ADG23123	Xyloglucan specific endoglucanase inhibitor	<i>Solanum melongena</i>	69 %
ACM68432	Xyloglucanase-specific endoglucanase inhibitor protein	<i>Petunia x hybrida</i>	70 %
AAN87262	Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor	<i>Solanum lycopersicum</i>	68 %
ACG48847	Xylanase inhibitor TAXI-IV	<i>Zea mays</i>	53%

2.3.2 Obtention de trois gènes codant des XEGIPs

Afin d'obtenir la séquence complète du gène d'intérêt, des RACEs en 3' et 5' ont été effectuées. Les premiers travaux se sont déroulés sur le plant sauvage mâle, puis sur le plant femelle Strisselspalt.

Suite à l'obtention de l'ADNc 3' RACE et 5' RACE, une première PCR a été effectuée respectivement avec les jeux d'amorces RevRinhx7-UPM et UPM-Rinhx7 (voir Tableau 2.1, page 39) sur ces deux ADNc. Une PCR complémentaire est effectuée sur ces produits de PCR avec les amorces RevRinhx7-NUP et NUP-Rinhx7.

Cette partie présente les résultats obtenus suite aux séquençages, qui mettront en évidence l'importance de cette première étape dans la construction du projet.

2.3.2.1 Identification d'un gène codant une XEGIP chez le plant mâle

Les PCR sur les RACEs en 3' et 5' ont permis l'isolement de deux amplifiats : un premier en 3' d'environ 400 pb (Figure 2.2, page 44) et un second, pour l'extrémité 5', de 1 200 pb (Figure 2.3, page 45). Après comparaisons et alignements des séquences clonées, la séquence complète a pu être définie. La séquence nucléotidique est composée de 1332 nucléotides et code une protéine de 444 acides aminés (Figure 2.4, page 46).

RevRinx7
→

GAATTGGCCCTTGTGCCTTGGATTTCGTTGACGGTGGTCCACTTAACTTCG 50
 TTGACTGGGGTGTTAAGTTACCCCAACTGCTGTTGTGATTGGAGGGCAT 100
 CAAATTGAGAACAATTTTCTTCTGTTTGATTGGGTGCTTCAAGGCTTGG 150
 TTTCAGCTCCTCTCTTCTGTTTAGACAAAACGACTTGTTCTAATTTCAACT 200
 TCAATTCTTCTACTTAC**TAG**AAGCGCGCGCGTACGTCGATCGACCTCATT 250

codon STOP

AATCCAGTTTTTATGGTATTTTCGAGGCCTTGTGTTTCGGCTGCTGTAAC 300
 TTTGTTTTTGGTGAACCTTAATGATAATTAATTAATGATTTGGGCTTCTT 350
 TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGT**ACTCTGCGTTGGATACCAC** 400

Queue Poly-A ← *NUP*

TGCTTAAGGGCGAATTC 417

Figure 2.2 – Séquence de la 3'RACE NUP-RevRinx7 sur le plant mâle.

NUP
→

GAATTCGCCCTT AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT ACGCGGGGAATTAAT 50
 AAAATTGATATATAAACTTCCCCTTGGAGAAGAAAATTATTTGGACGG 100
 TACTCCACCAACTACTACTTCATGGCTCAACTCCTATAGATAACCATAAC 150
 TTACTATCACATCTCCACGCCATCGACAAATACAAAACCTTCAAAA ATGG 200

codon START potentiel

CTTCCTCATTCTCTTTCAAGCTCTTCTTCTCCTCTTTCTCTTCTCTGCC 250
 CTTAGCTCTCATCTCGCCACAGCCAAAACAGCAGCATTCCCCAAAGCTCT 300
 TGTCTACCTGTTACAAAAGACACCACCCTCGCCAGTACATCACCCAAA 350
 TAACCCAAAGACCCCTCCAGTCCAACCTCAAAGTCGTCTAGATGTTGGT 400
 GGCGAATTCCTTTGGATTGACTGTGAAAAGGGCTACAAATCTTCTACCAA 450
 AAGGCCTGTCCCCTGCGGCTCACCACAATGTGTCCTGAGCGGGTCTGGGG 500
 CTTGTACTACCAGCGACAACCCATCAGACGTAGGCGTTTGTGGTGTGATG 550
 CCCAATAACCCTTTCTCATCAGTCGGCACTAGTGGTGATTTATTCGAAGA 600
 CATCTTATATATCCAATCCACCAACGGATTCAATCCCGGTAAACAAGTTT 650
 CAGTACCCAATCTACTTTTCTCGTGTGCACCCAACTCTCTTTAGAAGGC 700
 CTCGCAAGCGGAATCGTCGGTATGGCTGGCTTTGGAAGGAACAAAGTTGC 750
 GCTTCCTTCCTTGTCTCATCGGCTTTTAGCTTTCCAAGAAAGTTCGGCG 800
 TTTGCTTGTCTCTTCTAACGGTGTCATTTTCTTTGGAAGGAACCTTAT 850
 GTGTTGCTTCCTGGTATTGACGTCTCTGACCCTACGTCCTTGACTTACAC 900
 TCCGTTAATCCAAAACCCTAGAAGCCTCGTATCCAGTTTCGAAGGCAACC 950
 CATCAGCCGAATACTTCATCGGAGTCAAGTCCATTAAGGTCGACGGGAAG 1000
 CCCTTGAGGCTCAATACTACGCTGCTAACCTTCGACAACGAAGGTGGTCA 1050
 TGGGGGAACGAAGATAAGCACCGTTGATCCATTCAACAACATTGGAAACTT 1100
 CCATATACAAAGCCGTTGTTGGTGCCTTTGTCAAAGCTCTTGGGCCTAAG 1150
 GTTCCGAGAGTTAAGGCAGTTGCACCGTTCGGAGCTTGCTTTAATGCAAA 1200
 GTACATCGGCAGCACCCGAGTTGGGCCTGCCGTTCCCTCAGATCGATTTGG 1250
 TGTTGCGGAACGATAAGTTGTGGTGCATATTTGGTGCCAACCTCCATGGTT 1300

Rinhx7
←

AGTGTGTAATGATGTGTT GTGCCTTGGATTTCGTGACGGTGA AAGGGCGA 1350
 ATTC 1354

Figure 2.3 – Séquence de la 5'RACE NUP-Rinhx7 sur le plant mâle.

MASSFSFKLFFFLFLFSALSSHLATAKTAAFP~~KALVLPVTKDTTTRQYIT~~ 50
 QITQRTPPVQLKVVLDVGG~~EFLWIDCEKGYKSSTKRPVPCGSPQCVLSGS~~ 100
 GACTTSDNPSDVGVCGVMPNPFSSVGTSGDL~~FEDILYIQSTNGFNPGKQ~~ 150
 VSVPNLLFSCAPNSLLEGLASGIVGMAGFGRNKVALPSL~~FSSAFSFP~~ 200
 GVC~~LSSSN~~GVIFFGKEPYVLLPGIDVSDPTSLTYT~~PLIQNPRSLVSS~~FEG 250
 NPSAEYFIGVKS~~IKVDGKPLRFNTLLTFDNEGGHGGTKISTVDP~~FTTLE 300
 TSIYKAVVGAFVKALGPKVPRVKA~~VAPFGACFNAKYIGSTRVGP~~AVPQID 350
 LVL~~RNDKLWSIFGANS~~MVSVGNDVLC~~LG~~FVDGGPLNFVDWGVK~~FTPT~~AVV 400
 IGGHQIENN~~FLLFDLGASRLGFSSLLFRQTTCSN~~FNFNSSTY 443

Figure 2.4 – Séquence protéique complète issue des RACEs 3' et 5' sur le plant mâle.

2.3.2.2 Identification de gènes codant des XEGIPs chez le plant femelle

Sur le plant femelle Strisselspalt, la PCR de la RACE en 3' a permis d'isoler un amplifiat d'environ 470 pb (présenté à la figure 2.5, page 47) similaire à 97 % à la séquence initiale de l'EST. On constate la présence de la queue Poly-A, de 31 nucléotides, qui permet de confirmer la localisation du codon STOP putatif.

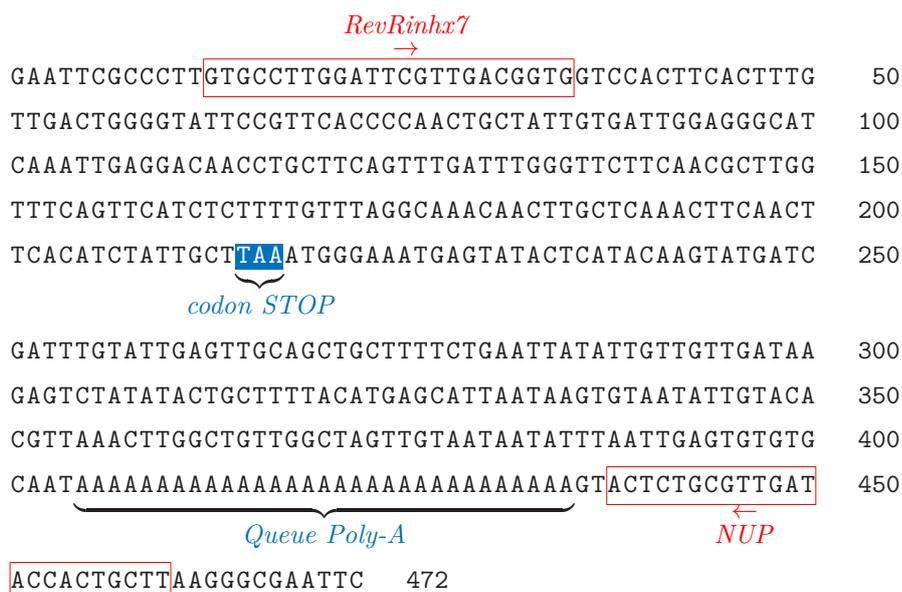


Figure 2.5 – Séquence de la 3'RACE NUP-RevRinhx7 sur le plant femelle.

La RACE en 5' a conduit à l'obtention d'un fragment d'environ 1 200 pb. Plusieurs clones issus du clonage en pCR4-TOPO sont analysés et sont décrits dans le tableau 2.4 (page 47). On observe une différence de similarité à la fois avec l'EST pour les clones n° 2 et n° 5 mais également avec la séquence obtenue chez le plant mâle, pour les clones n° 1 et n° 5.

Tableau 2.4 – Données relatives au clonage suite à la RACE en 5'.

Clone	Taille	Similarité avec l'EST	Comparaison avec la séquence obtenue sur le plant mâle
Clone n° 1	1241 bp	100 %	3 portions de séquences similaires à 82%, 72% et 79%
Clone n° 2	1232 bp	84 %	Séquence similaire à 99%
Clone n° 5	1221 bp	89 %	3 portions de séquences similaires à 76%, 76% et 74%
Clone n° 6 Clone n° 7	248 bp 229 bp	-	Pas de similarité identifiée

Les différences observées sur ces clones nous ont amené à définir de nouvelles amorces. Ainsi pour le clone n° 1, le jeu d'amorces UPM-Rinhx24 a permis de réaliser de nouvelles PCRs à partir des ADNc 3' RACE et 5' RACE (Figure 2.6, page 48). Un travail équivalent a été effectué pour le clone n° 5 avec l'amorce Rinhx25 (Figure 2.7, page 48). La séquence du clone n° 2 correspondant à 99 % de la séquence du plant mâle, aucune nouvelle amorce n'a été définie.

```

AGCTGTTATCGGTGCTTTTCGACAAAGCGGTGGCCAAAGTCCCGAGAGTTA 1049
      Rinhx24
      →
CGGCTGTGGC GCCTTTTCGAGCTATGCTTCAACTC GACTAGCTTCAGCAGC 1099
ACCCGAGTGGGGCCTGGCGT ACCTCAGATCGATTTGGTGTGCGGAACAA 1149
      ↑
      Début de l'EST (homologie de 100 %)
CAAAGCGTGGACCATTTTCGGTGCCAACCTCGATGGTTTCAGGTTAGTGATG 1199
ATGTGTTGTGCCTTGGATTGCTTGACGGTGAAGGGCGAATTC 1241

```

Figure 2.6 – Séquence du clone 1 de la 5'RACE NUP-Rinhx7 sur le plant femelle.

```

      Rinhx26
      →
AATACTGTAGTAAAT GCCTTTGTTAATGCGCTTGCTGTC CGTAACGTGCA 1019
CAAAGTTGCAGCAGTGGCGCCCTTCAGCGCATGTTTTAACGCCAAGGATA 1069
TCGGCCTCAGCCGAGCTGGGCCATTGTACCTCCGATTGAGTTTGTGTTG 1119
CAGAGTGAGAAAGTTGTGTGGAGAGTTACTGGTGCCAACCTCGATGGTTAG 1169
      ↑
      Début de l'EST (homologie de 89 %)
GGTCAGCAATGAGGTGTTGTGCCTTGGATTGCTTGACGTGAAGGGCGAAT 1219
TC 1221

```

Figure 2.7 – Séquence du clone 5 de la 5'RACE NUP-Rinhx7 sur le plant femelle.

Les RACEs successives et les nouveaux clonages ont permis de mettre en évidence trois séquences différentes, expliquant ainsi les différences présentées dans le tableau 2.4 (page 47). Un schéma récapitulatif est présenté en figure 2.8 (page 49). La séquence obtenue sur le plant mâle a été nommée inhibiteur n° 1 en raison de son antériorité. Du fait d'homologie de cette séquence avec la séquence du plant femelle trouvée à partir du clone n° 2 suite à la PCR en 5'RACE, cette dernière est également nommée inhibiteur n° 1. Les séquences découlant des clones n° 1 et n° 5 correspondent respectivement aux inhibiteurs n° 2 et n° 3. Les séquences protéiques de ces inhibiteurs sont présentées à la figure 2.9 (page 50).

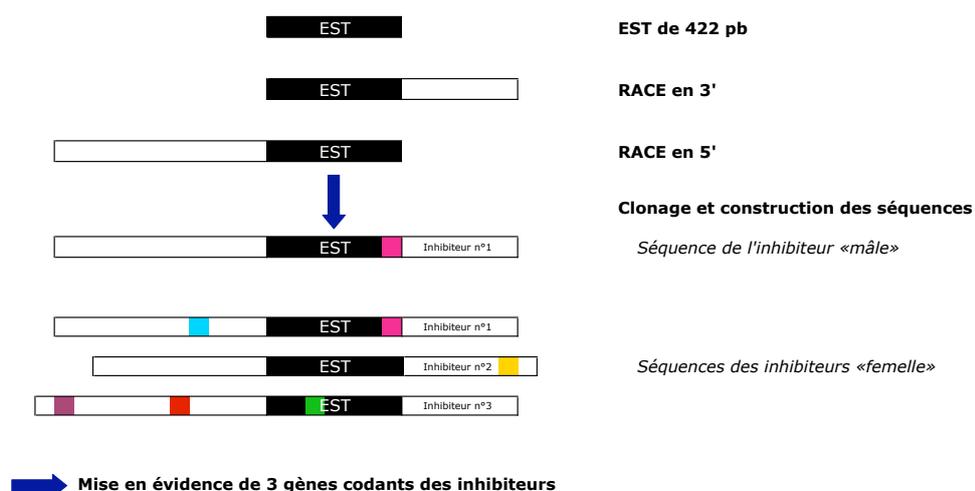


Figure 2.8 – Schéma représentant les différentes étapes ayant conduit à l'obtention de trois séquences codant des XEGIPs. Les différences pouvant exister entre les séquences sont représentées par des motifs de couleur.

Après extraction de l'ADNg de houblon de plants mâle et femelle, les séquences issues des RACEs ont été comparées avec l'ADNg. Ceci a permis de mettre en évidence l'absence d'intron dans les séquences des inhibiteurs et de confirmer les séquences obtenues à partir de l'ADNc.

L'identification de ces trois séquences différentes sur le plant femelle a conduit à définir de nouvelles amorces pour le plant mâle. Ces derniers travaux ont ainsi permis d'isoler les deux autres inhibiteurs. La comparaison de ces séquences avec celles du plant femelle sera abordée dans la partie suivante (Section 2.3.3.4, page 57).

Inhibiteur 1

MASSFSFKLFFFLFLFSALSSHLATAKTAAFP^KKALVLPVTKD^TTTTRQYIT 50
 QITQRTPPVQLKVVLDVGG^EFLWIDCEKGYKSSTKRPVPCGSPQCVLSGS 100
 GACTTSDNPSDVGVCGVMPNNPFSSVGTSGDLFEDILYIQSTNGFNPGKQ 150
 VSVPNLLFSCAPNSLLEGLASGIIGMAGFGRNKVALPSLFSSAFSFP^RKF 200
 GVC^LSSSN^GVIFFGKEPYVLLPGIDVSDPTSLTYTPLIQNPRSLVSSFEG 250
 NPSAEYFIGVKS^IKVDGKPLRLNTTLLTFDNEGGHGGTKISTVDPFTTLE 300
 TSIYKAVVGAFVKALGPKVPRVKAVAPFGACFN^AKYIGNTRVGPVAVPQID 350
 LVL^RNDKLWSIFGANS^MVSVGDDVLC^LGFVDGGPLNFVDWGVKFTPTAVV 400
 IGGHQIEN^NFLFDL^GASRLGFSSSLLFRQTTCSN^FNFNSSTY 443

Inhibiteur 2

MAS^FTHFVLFCSLLFPILITPTIAETPSFRPKALLLPVTKDASTKQYLTQ 50
 INQRTPLVPVKLTVNLGG^EFLWVDCEKGYVSSTYKPARCRSAQC^NLAGSK 100
 SCGECFDGPKPGCNNTCGLFPYNPFIRTSTSGELAQDIISI^QSTNGSNP 150
 SKVVSFPNVIFTCGSTFLL^EGLASGVTGIAGLGRKKIALPSQFAAAFSFK 200
 RKFALCLSSSTRATGVVFFGDGPYIMLPNKDVSQNL^IYTPLILNPVSTAG 250
 ASFEGEPSADYFIGVKGIK^VNGEDVKLNTSLLSI^AKDGTGGTKISTTQPY 300
 TSLETSIYKAVIGAFGKAVAKVPRVTAVAPFELCFN^STFSSTRVGPV 350
 QIDLVL^PNNKAWTIFGANS^MVQVSDVLC^LGFVDGGPLHFVDWGI^PFTPT 400
 AIVIGHQIEDNLLQFDL^GSSTLGFSSSLLFRQTTCSN^FNFTSIA 445

Inhibiteur 3

MSSNSFHLLFC^SLLLLIISPSISQTISFRPKALVLQVTKDSATHQYYTH 50
 ITQRTPPVQV^KVAIDLGG^EFLWVDCEKGFNSSTKKPVPC^RSAQC^NLAKSK 100
 ACSTNGNPSE^DVCG^EFPNPFISTSTSGDLSQDI^IYIQSTNGSRPGKVVS 150
 VPKFIFTCAPTFL^LKGLTSGAVGVAGLGRNKIALPSLFSAAFSFPK^MAV 200
 CLSSTNGVVFFGNGPYELSSGIDVSKSLTYTPLILNPVNLIGGFQ^ESSS 250
 EYFIGVKS^IKVDGKPVSVNSLLSFDVDGNGG^TKISTVDPYTTLET^SIYN 300
 TVVNAFVNALAVRN^VHKVA^AVAPFSACFN^AKDIGLSRAGPIVPP^IE^FVLQ 350
 SEKVVWRVTGANS^MVRVSN^EVLC^LGFVDGGPLHFVDWGIKFTPTAIVIGG 400
 RQIEDNLLQFDL^AT^SR^LGFSSSLLSRQLSCSN^FKFN^RSTVD 441

Figure 2.9 – Séquences protéiques complètes des trois inhibiteurs sur le plant femelle.

2.3.3 Caractérisation des trois XEGIPs

L'ensemble de la caractérisation des inhibiteurs est basé sur l'étude des séquences du plant femelle Strisselspalt. Ceci est en cohérence avec les cultures en houblonnières où les mâles sont rejetés. Les prochaines parties ne feront ainsi que peu d'allusions au plant mâle.

2.3.3.1 Données générales

Le tableau 2.5 (page 51) nous indique une similarité protéique entre les inhibiteurs de l'ordre de 80 % avec un pourcentage d'identité d'environ 67 %. Ces différences influent très faiblement sur la longueur des séquences, le poids moléculaire et le point isoélectrique (Figure 2.6, page 51). La figure 2.10 (page 52) présente l'alignement des trois inhibiteurs et illustre ainsi ces données.

Tableau 2.5 – Pourcentage d'identité et de similarité protéiques des trois inhibiteurs.

	Inh. n° 1	Inh. n° 2	Inh. n° 3	
Inhibiteur n° 1	—	79,8	80,7	% simil.
Inhibiteur n° 2	66,0	—	78,3	
Inhibiteur n° 3	68,2	67,2	—	
	% identité			

Tableau 2.6 – Données générales sur les inhibiteurs.

	Inhibiteur n° 1	Inhibiteur n° 2	Inhibiteur n° 3
Longueur (en nucléotides)	1332	1338	1326
Longueur (en acides aminés)	443	444	441
Poids moléculaire théorique (en kDa)	47,38	47,50	47,33
Point isoélectrique théorique	9,08	8,99	9,22

Les séquences protéiques ont été déposées sur les bases de données du NIH (National Institutes of Health, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sous les numéros d'accès suivants : GQ168516, GQ168517 et GQ168518, respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3.

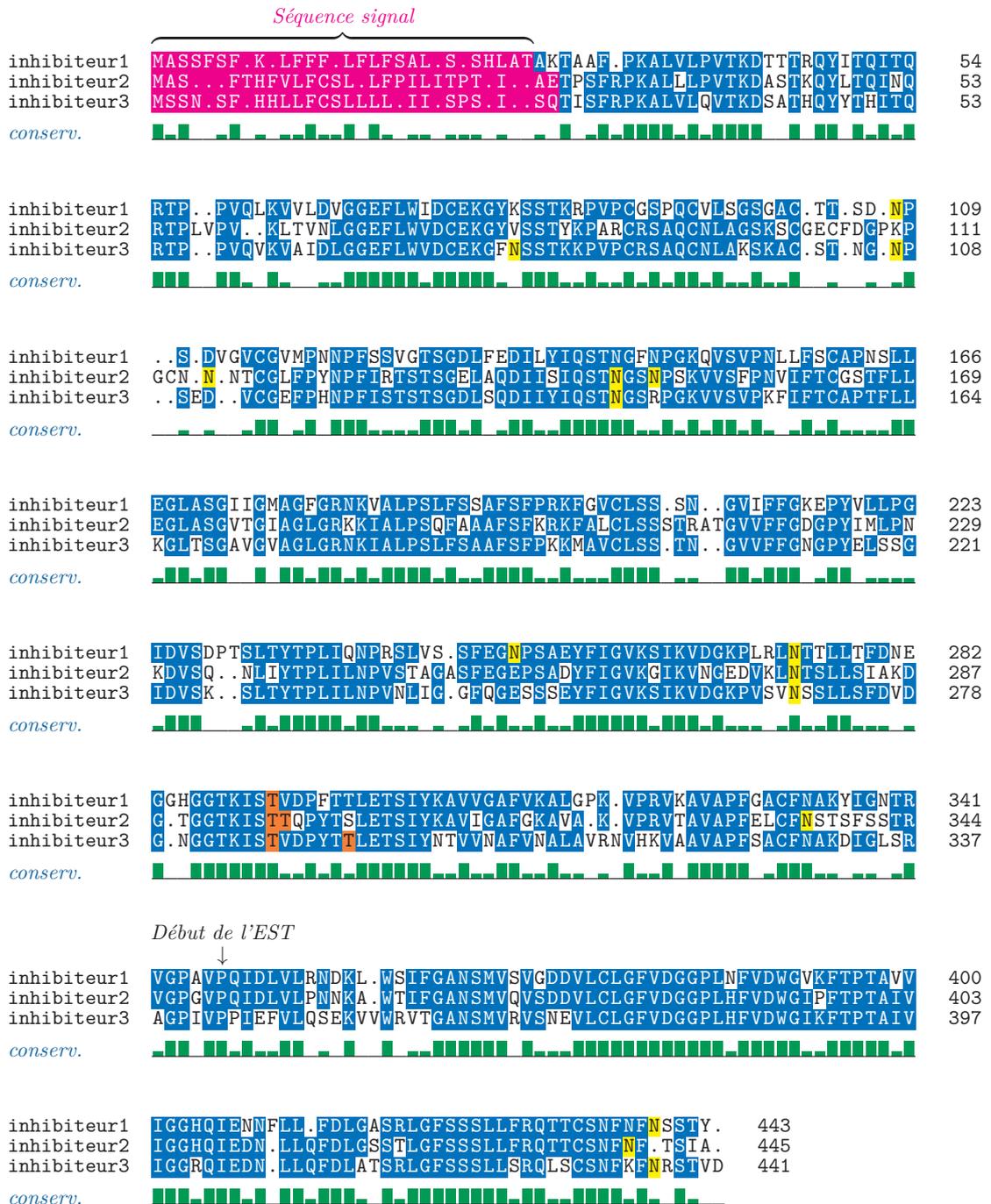


Figure 2.10 – Alignement des séquences protéiques des trois inhibiteurs (les N-glycosylations en **jaune** et les O-glycosylations **orange**).

2.3.3.2 Homologie dans les bases de données

Un BLASTp des trois séquences protéiques permet de retrouver des homologies avec les mêmes protéines décrites dans le tableau 2.3 (page 43), avec des e-values inférieures à e^{-122} . NEC4 du genre *Nicotiana* présente une similarité protéique de 72,5 %, 69,2 % et 77,5 % avec les trois inhibiteurs. Les pourcentages sont du même ordre de grandeur en comparant les inhibiteurs de houblon avec l'EDGP ou encore la XEGIP de la tomate (AAN87262). Cette homologie suggère des fonctions similaires, supposant ainsi que ces protéines de houblon auraient également la capacité à inhiber les enzymes de la famille des GH12.

De par leur rôle important dans la stabilité des protéines, la position des ponts disulfures a été étudiée de manière prédictive (tableau 2.7, page 53). La figure 2.11 (page 54) présente la position des cystéines après alignement de différentes XEGIPs avec nos inhibiteurs et montre que celle-ci est pleinement conservée entre les différents inhibiteurs. Néanmoins la position des ponts disulfures prédits varie selon les protéines comme entre la cong lutine- γ (CAC16394) et l'EDGP (BAA03413) [Scarafoni et al., 2010]. Concernant les XEGIPs du houblon, les ponts disulfures ne sont que partiellement conservés, comme entre l'inhibiteur n° 1 et l'inhibiteur n° 3 pour les positions en Cys₂-Cys₄, Cys₅-Cys₇ et Cys₆-Cys₉. Les homologies observées entre les différentes XEGIPs (Figure 2.11, page 54) tendent à suggérer des similarités dans leurs structures tridimensionnelles.

Tableau 2.7 – Sites prédits des ponts disulfures.

	Position prédite des ponts disulfures selon la position des cystéines.
Inhibiteur n° 1	1-3, 2-4, 5-7, 6-9 et 8-10
Inhibiteur n° 2	1-11, 2-3, 4-5, 6-12, 7-8 et 9-10
Inhibiteur n° 3	1-10, 2-4, 3-8, 5-7 et 6-9

La glycosylation est une modification post-traductionnelle et confère notamment aux protéines une bonne conformation et une stabilité [Dwek, 1998, Shental-Bechor and Levy, 2008]. Ce point sera d'ailleurs amplement abordé lors des chapitres suivants, car leur absence sur une protéine recombinante peut entraîner la perte de fonction de la protéine en question. Les sites prédits des glycosylations sont présentés dans le tableau 2.8 (page 54) et sont indiqués à la figure 2.10 (page 52). Ils sont au nombre de 4, 6 et 5, respectivement pour l'inhibiteur n° 1, l'inhibiteur n° 2 et l'inhibiteur n° 3. Ces sites sont parfois conservés ou dans un environnement proche, comme en N₁₀₈/N₁₁₅/N₁₀₇ ou en fin de la séquence C-terminale. Les XEGIPs EDGP (BAA03413) [Satoh et al., 1992], NEC4 (AAX81588) [Naqvi et al., 2005] et celle de la tomate (AAN87262) [Qin et al., 2003] présentent respectivement 4, 4 et 5 sites prédits de glycosylation. Au moins l'un d'entre eux se trouve en fin de séquence C-terminale comme nos inhibiteurs. Cette région est d'ailleurs celle présentée comme déterminante dans les caractéristiques d'inhibition et notamment pour les inhibiteurs de xylanases [Payan et al., 2003, Sansen et al., 2004]. Ces sites sont bien conservés autour du résidu asparagine n° 273 (en prenant comme référentiel, l'inhibiteur n° 1) et ce pour les trois inhibiteurs du houblon. Le site prédit en N₁₁₅ de l'inhibiteur n° 2 est également conservé pour l'ensemble des XEGIPs analysées.

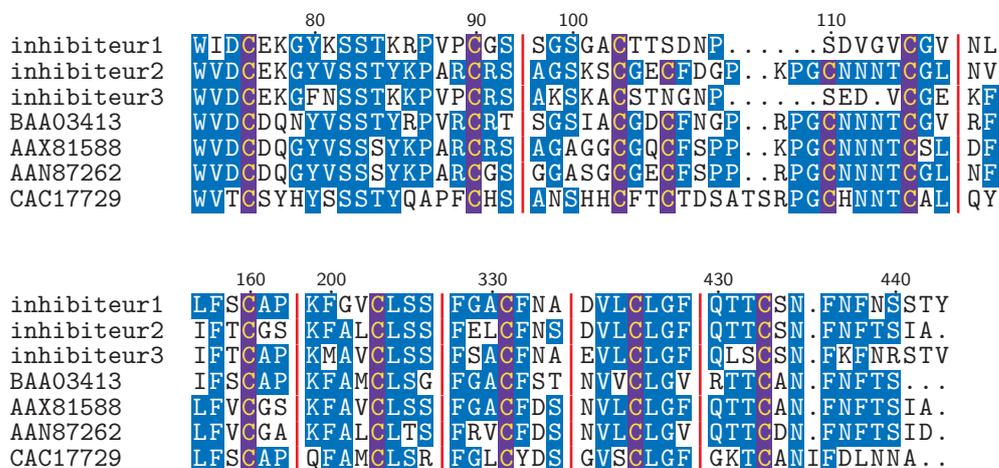


Figure 2.11 – Alignement de XEGIPs et mise en évidence de la conservation des cystéines. BAA03413 : EDGP, AAX81588 : NEC4, AAN87262 : XEGIP de *Lycopersicon esculentum*, CAC17729 : conglutine- γ . En bleu apparaissent les résidus conservés à plus de 50 %.

Tableau 2.8 – Sites prédits des N- et O-glycosylations.

	N-glycosylation	O-glycosylation
Inhibiteur n° 1	N ₁₀₈ , N ₂₅₁ , N ₂₇₃ et N ₄₃₉	T ₂₉₂
Inhibiteur n° 2	N ₁₁₅ , N ₁₄₆ , N ₁₄₉ , N ₂₇₈ , N ₃₃₆ et N ₄₄₀	T ₂₉₆ et T ₂₉₇
Inhibiteur n° 3	N ₈₀ , N ₁₀₇ , N ₁₄₁ , N ₂₆₉ et N ₄₃₆	T ₂₈₇ et T ₂₉₃

L'arbre phylogénique (Figure 2.12, page 55), montre plusieurs groupes représentant les types d'inhibiteurs. Les inhibiteurs de type XIP, TAXIs ainsi que TLXI se trouvent nettement dissociés et forment des clusters à part entière. Les XEGIPs forment également un cluster et les inhibiteurs de houblon en font partie, montrant ainsi leur appartenance à cette famille.

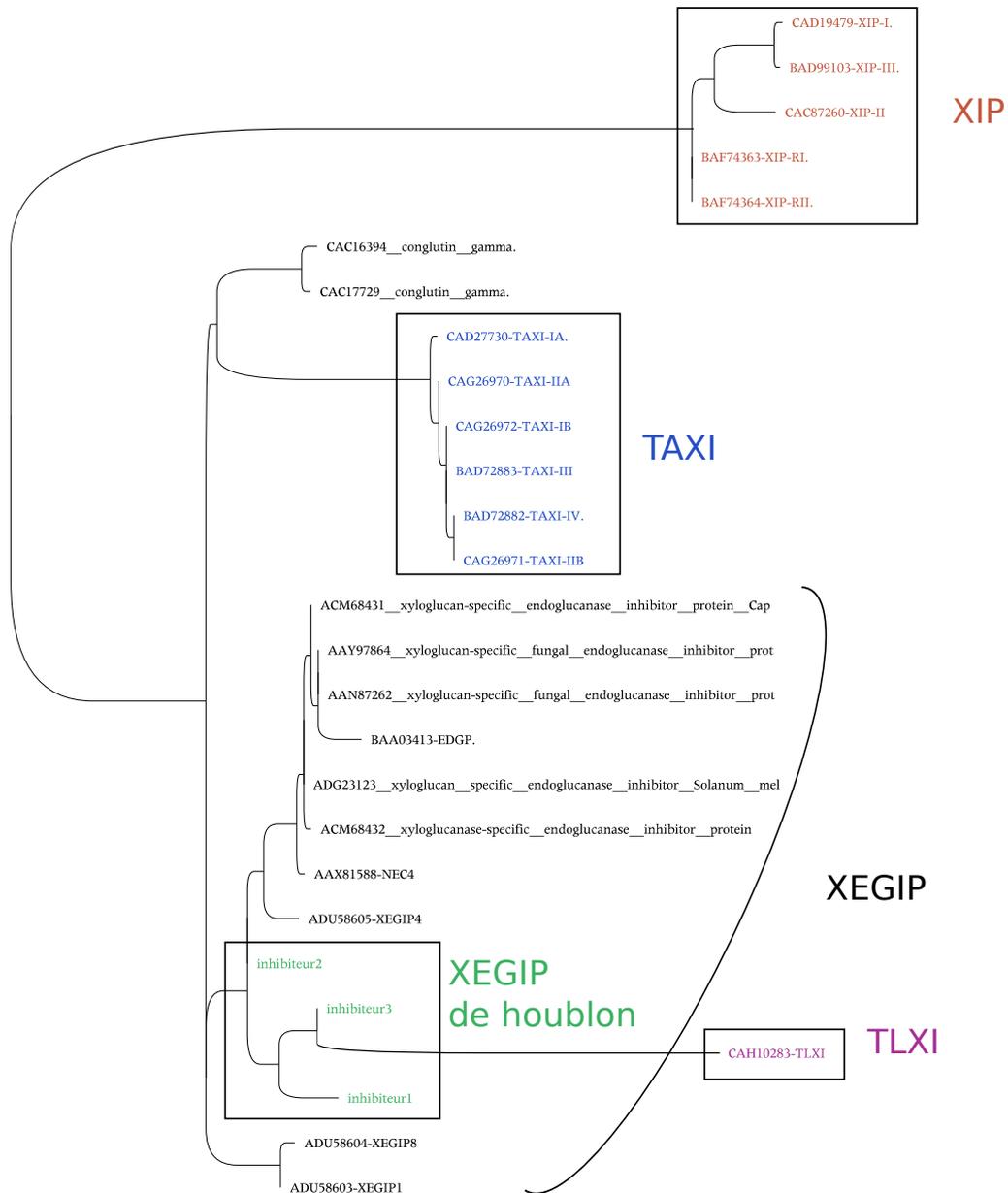


Figure 2.12 – Arbre phylogénétique. Inhibiteurs de type TAXI isolés chez *Triticum aestivum* : CAD27730-TAXI-IA, CAG26970-TAXI-IIA, CAG26972-TAXI-IB, CAG26971-TAXI-IIB, BAD72883-TAXI-III, BAD72882-TAXI-IV. Inhibiteurs de type XIP : CAD19479-XIP-I xylanase inhibitor protein I [*Triticum aestivum*]; CAC87260-XIP-II putative xylanase inhibitor protein [*Triticum turgidum subsp. durum*]; BAD99103-XIP-III xylanase inhibitor XIP-III [*Triticum aestivum*]; BAF74363-XIP-RI xylanase inhibitor [*Triticum aestivum*]; BAF74364-XIP-RII xylanase inhibitor [*Triticum aestivum*]. Inhibiteurs de type TLXI : CAH10283-TLXI [*Triticum aestivum*]. Inhibiteurs de type XEGIP : AAX81588-NEC4 nectarin IV [*Nicotiana langsdorffii* x *Nicotiana sanderae*]; BAA03413-EDGP [*Daucus carota*]; ADU58603, ADU58605 et ADU58604 : XEGIP1, 4 et 8 [*Solanum tuberosum*]; CAC17729 et CAC16394 γ -conglutin [*Lupinus albus*]; ACM68432 xyloglucanase-specific endoglucanase inhibitor protein [*Petunia x hybrida*]; AAN87262 xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor [*Lycopersicon esculentum*]; AAY97864 xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor [*Solanum lycopersicum*]; ADG23123 xyloglucan specific endoglucanase inhibitor [*Solanum melongena*]; ACM68431 xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor protein [*Capsicum annum*].

2.3.3.3 Occurrence

Les similarités qu'il peut exister entre les XEGIPs et des ESTs issus d'un grand nombre d'espèces végétales suggèrent que les gènes codant les XEGIPs ou des protéines de la même famille, sont largement répandues dans le monde végétal. Des amorces spécifiques aux inhibiteurs ainsi qu'un jeu d'amorces commun aux trois, ont été définies (présentées en tableau 2.1, page 39). Des amplifications à l'aide de ces amorces ont été effectuées sur l'ADN génomique de plusieurs espèces végétales : *C. sativa*, *Lupinus sp.*, *Urtica sp.*, *Solanum lycopersicum*. Le choix a été fait de se concentrer spécifiquement sur deux plantes : *C. sativa* du fait de son appartenance à la famille des Cannabinacées et *Lupinus sp.* présentant une « XEGIP-like », la conglutine- γ [Scarafoni et al., 2010]. Les résultats obtenus sont présentés en figure 2.13 (page 56). À l'exception de l'inhibiteur n°2 pour *C. sativa*, chaque amorce amplifie un segment d'ADN laissant supposer la présence de gènes proches des inhibiteurs chez ces deux plantes.

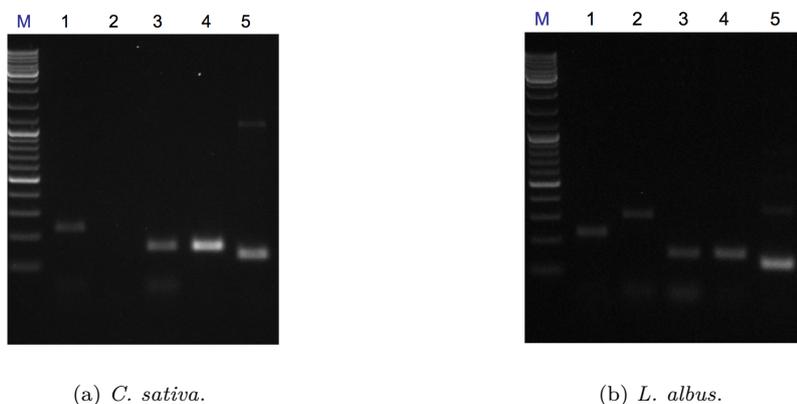


Figure 2.13 – Produits de PCR à partir d'extraits d'ADN génomique de *C. sativa* (Figure 2.13a) ou de *L. albus* (Figure 2.13b). Les amorces utilisées sont les amorces spécifiques à chaque inhibiteur (puits 1 à 3), le jeu d'amorces commun aux trois inhibiteurs (puits 4) et l'ubiquitine en tant que contrôle positif de la PCR (puits 5).

Un séquençage a été effectué sur les produits de PCR issus des amorces communes aux trois inhibiteurs. Deux fragments nucléotidiques d'environ 120 pb ont ainsi été reconstitués et alignés avec les inhibiteurs de houblon et dans le cas du lupin avec la séquence AJ297568, codant pour la XEGIP de *L. albus*. Dans le cas du cannabis, les pourcentages d'identité nucléotidique obtenus ont été de 93,1 %, 86,3 % et 86,3 % respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3. Ce taux de recouvrement élevé s'explique par l'appartenance du cannabis à la même famille que le houblon et permet d'affirmer la présence d'au moins un inhibiteur de type XEGIP chez le cannabis. Dans le cas du lupin, les scores obtenus ont été de 65 %, 59 % et 58 % respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3, pouvant également laisser supposer à la présence d'inhibiteur de type XEGIP. Cette séquence a été comparée avec la XEGIP décrite par Scarafoni et collaborateurs [Scarafoni et al., 2010]. Le score obtenu est uniquement de 24 %. Deux hypothèses sont alors à envisager :

- l'existence dans le génome du houblon d'un autre, voire de plusieurs, inhibiteur(s) de type XEGIP. Néanmoins pour une même espèce, comme c'est le cas du houblon, les similarités nucléotidiques entre deux inhibiteurs devraient être plus élevées que 24 % et avoisineraient plutôt 50 à 70 %.
- la mauvaise attribution de l'appellation XEGIP pour cette protéine de *L. albus*. Les

essais d'inhibition de cette protéine ne se sont d'ailleurs pas montrés concluants [Scarafoni et al., 2010] et pour l'heure la fonction putative de cette protéine n'a pas été validée.

2.3.3.4 Variations génétiques

Les différences existantes entre les inhibiteurs des plants mâles et ceux des plants femelles sont très faibles comme le présente le tableau 2.9 (page 57).

Tableau 2.9 – Comparaison des séquences protéiques des inhibiteurs des plants mâle et femelle.

	Inhibiteur n° 1	Inhibiteur n° 2	Inhibiteur n° 3
Pourcentage d'identité	99%	98%	100%
Identité protéique	439/443	438/445	441/441
Similarité protéique	442/443	438/445	441/441

2.3.3.5 Distribution spatiale

iPSORT nous a permis de déterminer la séquence signal probable des trois inhibiteurs. Celle-ci se situe entre le premier acide aminé et le vingt-cinquième (Figure 2.10, page 52). D'après le programme Plant-mPLOC, les inhibiteurs sont situés dans la membrane plasmique. Néanmoins selon ce même programme, des protéines telles que NEC4, appartenant à la famille des EDGPs et donc extracellulaires [Naqvi et al., 2005, Shang et al., 2005], présentent également une localisation prédite dans la membrane plasmique, laissant supposer une mauvaise localisation prédite. Le programme WOLFPSORT [Horton et al., 2007] laisse apparaître pour les XIPs, NEC4 et nos inhibiteurs une localisation dans le chloroplaste. Les TAXIs donnent quant à eux de très bons scores pour une sécrétion en milieu extracellulaire. La localisation des inhibiteurs de xylanases, pressentie comme extracellulaire, a en fait été confirmée uniquement pour certaines XIPs (dont XIP-R1) et ce dans l'espace apoplasmique [Takahashi-Ando et al., 2007].

2.4 Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence pour la première fois chez le houblon l'existence de protéines pouvant être des inhibiteurs de la famille des XEGIPs. Le domaine « *xylanase-inhibitor* » obtenu par BLAST de l'EST, les similarités avec d'autres XEGIPs, la conservation des cystéines sont autant d'indices permettant de classer ces trois protéines du houblon dans la famille des inhibiteurs de xyloglucanase. Ces protéines sont fortement répandues chez les plantes et leurs liens étroits avec les réactions de défenses de la plante ont été validées pour certaines de ces protéines. La localisation apoplasmique des XEGIPs du houblon pourrait d'ailleurs être favorable à l'action des inhibiteurs sur les enzymes fongiques dégradant les parois. En effet, l'apoplaste constitue l'espace extracellulaire de la plante, incluant les parois végétales. Il représente un compartiment dynamique servant de continuum des racines jusqu'aux feuilles à travers la tige. La dégradation causée par des CWDEs place l'apoplaste comme la première ligne de défense de la plante. Cette matrice extracellulaire contribue d'ailleurs fortement à la réponse des plantes aux stress abiotiques et biotiques, comme l'a montré récemment une étude sur le peuplier [Pechanova et al., 2010].

À l'heure actuelle, aucune étude comparative des différents homologues de XEGIPs pour une plante donnée n'a été référencée. Une étude traitant du rôle d'une XEGIP de *Nicotiana benthamiana* dans les interactions avec des pathogènes [Xie et al., 2008] est néanmoins intéressante. Un premier couple d'amorces a permis l'obtention chez *N. benthamiana* d'une protéine nommée NbXEGIP1 (TC7425) ayant une identité nucléotidique de 86 % et 84 % avec deux séquences de XEGIPs putatives provenant respectivement de *Solanum tuberosum* (AY321357) et de *Lycopersicon esculentum* (AY155579). À partir d'un nouveau jeu d'amorces, basé sur des régions conservées de gènes codant des XEGIPs et des gènes homologues à l'EDGP chez d'autres plantes, une nouvelle protéine a pu être mise en évidence. Celle-ci, appelé NbXEGIP2, présente un pourcentage d'identité nucléotidique de 58 % avec NbXEGIP1 et de 84 % avec l'EDGP putative de la tomate. Ceci témoigne de la présence de deux protéines homologues.

Naqvi et collaborateurs ont isolé chez le tabac (après détermination des séquences nucléotiques par RACES) deux gènes différents codant des XEGIPs et présentant une identité supérieure à 99 %. Cette similarité pourrait suggérer que ces gènes proviennent d'un gène commun ayant récemment divergé dans l'évolution, comme suggéré par les auteurs. Néanmoins, il est plus probable qu'il s'agisse d'un croisement interspécifique entre deux espèces [Naqvi et al., 2005]. Ces différences sont du même ordre de grandeur que celles observées entre les gènes des XEGIPs de houblon mâle et de houblon femelle. Il est fait mention de la présence chez la tomate de 5 gènes « XEGIP-related » dans les bases de données [Qin et al., 2003]. Après comparaison avec la XEGIP publiée (AAN87262), ces homologues présentent un pourcentage d'identité nucléotidique allant de 24 % (Tomato-2) à 51 % (XEGIP-5). Ces protéines n'ont pour l'heure pas été étudiées et sont uniquement présentes dans les bases de données du NIH. Chez la carotte, l'observation en gel 2D de plusieurs spots et une analyse en spectrométrie de masse montrent la présence de deux isoformes d'EDGP [Shang et al., 2005]. Récemment des homologues d'une XEGIP putative de *Solanum tuberosum* (AAP84703, décrite pour la première fois en 2006, [Jones et al., 2006]) ont été ajoutés aux bases de données du NIH : XEGIP1 (ADU58603), XEGIP5 (ADU58603) et XEGIP8 (ADU58604). Le pourcentage de similarité protéique est variable selon les protéines avec par exemple 88 % entre la XEGIP1 et la XEGIP8, 59,6 % et 71,4 % pour les autres.

Les séquences des inhibiteurs de xyloglucanase du houblon ayant été obtenues, l'étape suivante est à la production de ces protéines. La validation de leur propriété inhibitrice est en effet nécessaire afin de répondre aux questions suivantes : ces protéines sont-elles des inhibiteurs de xyloglucanase ? Leur classement dans la famille des XEGIPs leur confèrent-elles des propriétés d'inhibition identiques ? Ou au contraire, montrent-ils une spécificité leur permettant d'inhiber d'autres familles de GH en plus des GH12 ? Enfin existe-t-il des différences particulières dans l'action de ces trois protéines, en terme de spécificité ou selon leur propriété inhibitrice ?

PRODUCTION, EXPRESSION ET PURIFICATION

Sommaire

3.1	Introduction	63
3.2	Matériels et méthodes	64
3.2.1	Microorganismes utilisés	64
3.2.1.1	Souches bactériennes et vecteurs d'expression	64
3.2.1.2	Levure et vecteurs d'expression	64
3.2.1.3	Cellules d'insectes et vecteurs d'expression	65
3.2.2	Techniques de biologie moléculaire	65
3.2.2.1	Extraction d'ADN et purification	65
3.2.2.2	Clonage	65
3.2.3	Culture et production protéique	71
3.2.4	Préparation des protéines solubles	71
3.2.5	Préparation des protéines insolubles et renaturation	72
3.2.6	Purification de protéines	73
3.2.7	Analyses des protéines	74
3.2.8	Immunodétection	75
3.2.8.1	Production des anticorps primaires	75
3.2.8.2	Purification des anticorps primaires	75
3.2.8.3	Western-Blot	76
3.2.9	Analyse en spectrométrie de masse	77
3.3	Résultats	78
3.3.1	Premiers essais en système bactérien	78
3.3.1.1	Travaux sur les protéines solubles	78
3.3.1.2	Travaux sur les corps d'inclusion	81
3.3.2	Utilisation d'autres systèmes de production	84
3.3.2.1	Utilisation des souches ArcticExpress TM , Origami TM 2(DE3) et SHuffle TM	84
3.3.2.2	Utilisation du pET-39b	86
3.3.3	Production en système <i>Pichia pastoris</i>	88
3.3.3.1	Production intracellulaire avec le vecteur pPICZB	88
3.3.3.2	Production dans le milieu extracellulaire	90
3.3.4	Production en cellules d'insectes	90
3.3.4.1	Production avec le vecteur pAcSG His	90
3.3.4.2	Production avec le vecteur pAcGP67B	92
3.4	Discussion	94

3.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, la caractérisation de trois gènes codant des XEGIPs a été décrit. La production des protéines correspondantes est la seconde étape de ce projet et a pour but principal de valider leur fonction prédite. Afin de déterminer les mécanismes d'interactions entre les XEGIPs et les enzymes cibles, le choix a été fait de travailler à partir de protéines recombinantes.

Au cours des travaux de production des trois XEGIPs de houblon, plusieurs systèmes de production ont été étudiés. La production avec succès d'enzymes de *F. graminearum* en système bactérien au sein du laboratoire [Carapito et al., 2009] nous a conduit à mener les premières productions dans ce système. Ce système d'expression est classiquement utilisé en laboratoire et est largement étudié. Il présente de nombreux avantages en terme de coût, de facilité à la mise en place et donne la possibilité de jouer sur de nombreux paramètres tels que les conditions de culture (température, milieu) ou les constructions (vecteurs et souches utilisés). Les inconvénients connus de ce système en terme de solubilité et d'environnement défavorable à la formation des ponts disulfures nous ont également amené à effectuer des travaux complémentaires sur d'autres systèmes de production : le système levure et le système en cellules d'insectes. Ces deux systèmes sont connus pour permettre les transformations post-traductionnelles, et ont été utilisés avec succès pour l'expression de protéines de plantes [Fierens et al., 2004, Micheelsen et al., 2008, Consonni et al., 2010].

La production d'anticorps polyclonaux sera également abordée dans cette partie. Les techniques mises en place à partir de cet outil auront pour but la détection ou la validation de la présence des protéines recombinantes, la purification des protéines recombinantes par les anticorps, ainsi que d'autres stratégies qui seront abordées dans les prochains chapitres (la caractérisation des inhibiteurs natifs, la détermination de la localisation spatiale des inhibiteurs sur la plantes, la recherche d'enzymes cibles par immunoprécipitation, ...).

Enfin, la production de protéines entraîne le plus souvent la nécessité d'étapes de purification. Selon la protéine d'intérêt et le système utilisé, la protéine recombinante sera produite en même temps que d'autres protéines propres au système. Cette proportion entre la protéine d'intérêt et les protéines contaminantes se révélera être le plus souvent faible lors d'un travail dans le système *P. pastoris*, mais sera très élevée avec *E. coli*. Ceci va nécessiter la mise en place de stratégies de purifications adaptées, qui pourront être basées sur des interactions protéines-protéines (comme avec les anticorps) ou sur les propriétés intrinsèques de la protéines recombinantes, telles que les interactions ioniques.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Microorganismes utilisés

3.2.1.1 Souches bactériennes et vecteurs d'expression

Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées lors de ce projet.

La souche *E. coli* TOP10 (Invitrogen) est utilisée lors des clonages. Les souches *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs), OrigamiTM2(DE3) (Novagen), ArcticExpressTM(DE3) (Agilent Technologies) et la souche SHuffleTMT7 express sont utilisées en tant que souche d'expression protéique. Deux vecteurs ont été utilisés : le vecteur pET-30a(+) et le vecteur pEt-39b(+). Le tableau 3.1 (page 64) présente l'ensemble des résistances des souches et vecteurs en question.

Tableau 3.1 – Antibiotiques utilisés pour les différents systèmes d'expression.

Système d'expression	Souche ou vecteur	Résistance
-	TOP10	Streptomycine à 50 µg/ml
Système bactérien (<i>E. coli</i>)	BL21(DE3)	-
	Origami TM 2(DE3)	Streptomycine à 50 µg/ml Tétracycline 50 µg/ml
	SHuffle TM	Streptomycine à 50 µg/ml
	ArcticExpress TM	Gentamycine à 20 µg/ml
	pET-30a pEt-39b	Kanamycine à 30 µg/ml
Système levure (<i>P. pastoris</i>)	X33	Streptomycine à 25 µg/ml
	pPICZαB pPICZB	Zeocine à 100 µg/ml
Système en cellules d'insectes (<i>Sf9</i>)	pAcSG pAcGP67B	Ampicilline à 50 µg/ml

3.2.1.2 Levure et vecteurs d'expression

La levure utilisée est la souche *P. pastoris* X33 (Invitrogen). Les constructions sont réalisées à partir d'un des deux vecteurs suivants : le vecteur pPICZαB et le vecteur pPICZB. Les résistances aux antibiotiques de ces constructions sont présentées dans le tableau 3.1 (page 64).

3.2.1.3 Cellules d'insectes et vecteurs d'expression

Les premiers travaux ont été entrepris avec le vecteur pAcSG His (PharMingen) puis avec le vecteur pAcGP67B (BD Biosciences) dont la présence d'un peptide signal permet d'induire la production des protéines dans le milieu extracellulaire. Les résistances aux antibiotiques de ces constructions sont présentées dans le tableau 3.1 (page 64). La souche des cellules d'insectes utilisées est la souche *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*).

3.2.2 Techniques de biologie moléculaire

3.2.2.1 Extraction d'ADN et purification

Les extractions d'ADN plamidiqes sont réalisées par le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). La purification de l'ADN a lieu entre chaque étape de clonage avec l'utilisation du kit Nucleopin Extract II (Macherey Nagel).

3.2.2.2 Clonage

Les clonages ont été effectués à partir des clones en pCR®4-TOPO® définis dans le chapitre 2 (Section 2.2.2.4, page 40). Les PCRs sont réalisées avec la TAQ-polymerase, iProof (Biorad) à haute fidélité et avec les amorces définies dans le tableau 3.2 (page 70). La ligation s'effectue avec la ligase T4 (Fermentas), selon le protocole indiqué par le fournisseur. Les enzymes de restrictions utilisées dans ce projet proviennent de la société Fermentas.

La sélection des clones après transformation en TOP10 chimiocompétentes s'effectue sur boîte LB contenant la résistance appropriée (Tableau 3.1, page 64). Pour les constructions dans le système levure, le milieu de base a la composition suivante : 1 % Tryptone, 0,5 % NaCl et 0,5 % d'extrait de levure.

Après sélection des colonies résistantes, la présence de l'insert dans les clones est vérifiée par PCR sur colonies (Section 2.2.2.4, page 40), puis par séquençage avec les amorces correspondantes. Les plasmides sélectionnés sont transformés dans les souches d'expression protéiques appropriées. La présence de l'insert dans les transformants est de nouveau vérifiée par PCR sur colonies, à l'exception des clones dans la souche X33, pour lesquels le kit REExtract-N-Amp Plant PCR (Sigma) est utilisé (méthode plus adaptée pour le criblage de nombreux clones). Pour les travaux en cellules d'insectes, les vecteurs sont transmis à la plate-forme baculovirus de l'IGBMC.

Les paragraphes suivants précisent les conditions particulières pour chaque construction.

Dans le **pET-30a**, les premières constructions ont été effectuées à partir de l'inhibiteur n° 1 mâle, avec les amorces inhx15pro et inhx16pro, et les digestions en *Bam*HI et *Hind*III. Les constructions suivantes ont été réalisées pour les trois inhibiteurs femelles, avec deux constructions présentant un tag en histidine en N-terminal ou en N- et C-terminal, respectivement avec les amoces inh x pro - Stopinh x et inh x pro-Stopinh x présentés dans le tableau 3.2 (page 70) (où x représente le numéro de l'inhibiteur). La figure 3.1 (page 66) donne un exemple pour l'inhibiteur n° 1 de la construction obtenue dans le pET-30a.

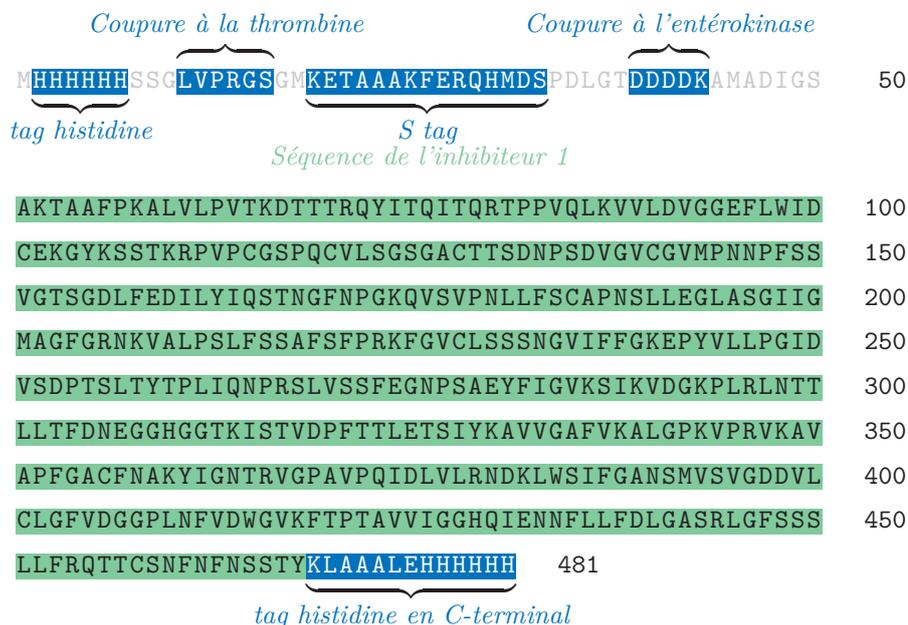


Figure 3.1 – Séquence protéique de l'inhibiteur n° 1 dans le vecteur pET-30a.

Pour les travaux dans le **pET-39b**, l'insert de l'inhibiteur n° 1 est extrait à partir de la construction dans le pET-30a par digestion avec les enzymes de restriction *KpnI* et *XhoI*. Pour l'inhibiteur n° 2 et l'inhibiteur n° 3, de nouvelles amorces « sens » ont dû être définies (voir tableau 3.2, page 70). Les amorces « antisens » correspondent à celles du clonage dans le pET-30a : Stopinh2 et Stopinh3. Les produits de PCR correspondant ont été digérés par *NcoI-SacI* et *NcoI-HindIII*, respectivement pour les inhibiteurs n° 2 et n° 3 puis insérés dans le pET-39b. Après transformation en TOP10 et séquençage, les vecteurs issus des clones sélectionnés sont transformés dans BL21(DE3) pour l'expression des protéines. La figure 3.2 (page 67) donne un aperçu de la construction dans ce vecteur pour l'inhibiteur n° 1. *DsbA* fait référence à la Disulfide oxidoreductase A, présente sur ce vecteur, une séquence signal pouvant améliorer la solubilité de la protéine recombinante. Les constructions des souches **ArcticExpress™**, **Origami™2** et **SHuffle™** ont été réalisées par transformation de bactéries chimio-compétentes à partir de 20 ng de plasmide (vecteur pET-30a + insert des inhibiteurs).

Les constructions en **système levure** sont basées sur plusieurs stratégies :

- l'utilisation du vecteur pPICZαB dont la séquence signal permet la sécrétion de la protéine recombinante,
- l'utilisation du vecteur pPICZB qui permet soit d'inclure la séquence signal de nos protéines d'intérêt, soit d'effectuer le clonage sans celle-ci.

L'utilisation du vecteur pPICZB incluant la séquence signal de la protéine d'intérêt a été effectuée uniquement sur l'inhibiteur n° 1. L'amplification de l'insert est effectuée avec les amorces Inh1_pPICZB_f et Inh1_pPICZB_R (tableau 3.2, page 70), le produit de PCR est ensuite digéré par *KpnI* et *NotI*. L'amplification des inserts pour les deux autres constructions, en pPICZαB et en pPICZB sans séquence signal, est réalisée à partir des amorces du tableau 3.2 (page 70) et digérée par *PstI-NotI* et *XhoI-NotI*, respectivement pour

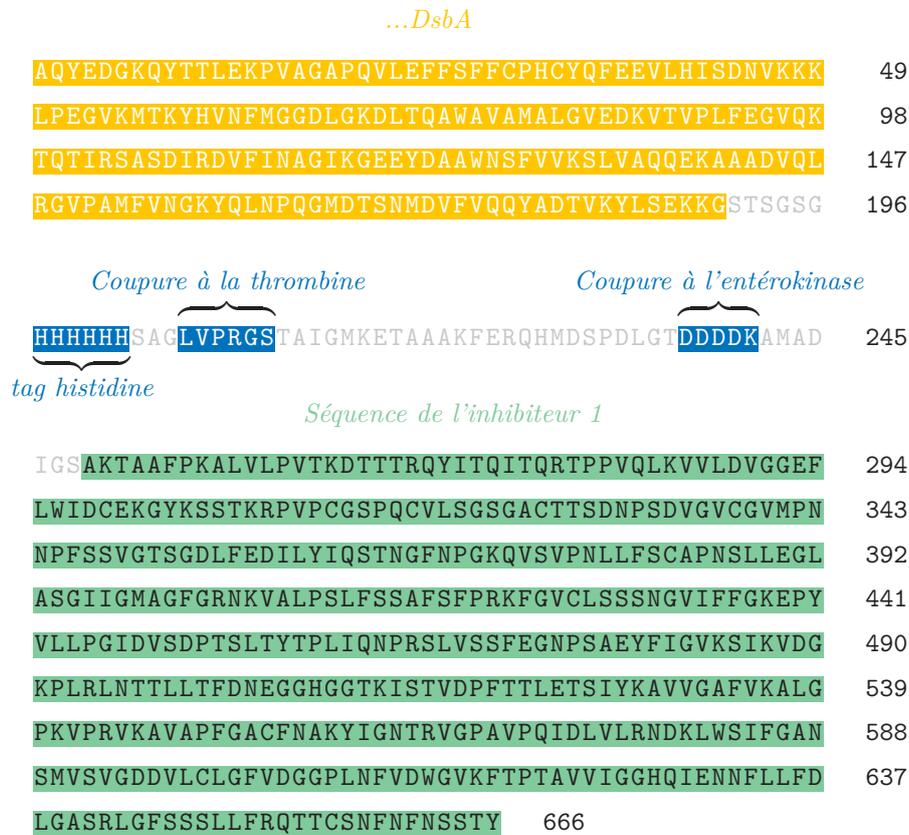


Figure 3.2 – Séquence protéique de l'inhibiteur n° 1 dans le vecteur pET-39b.

les vecteurs pPICZ α B et pPICZB. Les plasmides issus de la transformation en TOP10 sont linéarisés par SacI puis transformés par électroporation dans des levures électrocompétentes de souche X33. L'électroporation s'effectue selon les paramètres suivants : 25 μ FD, 200 ohms et 1,5 KVols. Les transformants sont ensemencés sur boîtes YPD (*Yeast Potato Dextrose* : 1 % d'extrait de levures, 2 % de peptone, 2 % de dextrose, 2 % d'agar) contenant 100 μ g/ml de zeocine. Les constructions en *P. pastoris* sont représentées sur les figures 3.3 et 3.4 (page 68 et page 68) respectivement pour pPICZ α B et pPICZB.

Les clonages dans le vecteur **pAcSG His** pour le système baculovirus ont été effectués sur la plate-forme clonage de l'IGBMC après insertion des inserts des trois inhibiteurs sur les sites XhoI et BglII. Le travail sur le vecteur **pAcGP67B** a nécessité la conception de nouvelles amorces (tableau 3.2, page 70). Le vecteur et les produits de PCR sont digérés par les enzymes de restriction suivantes : *Bam*HI-*Not*I, *Nco*I-*Not*I et *Nco*I-*Not*I, respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3. La construction obtenue est représentée en figure 3.5 (page 69).

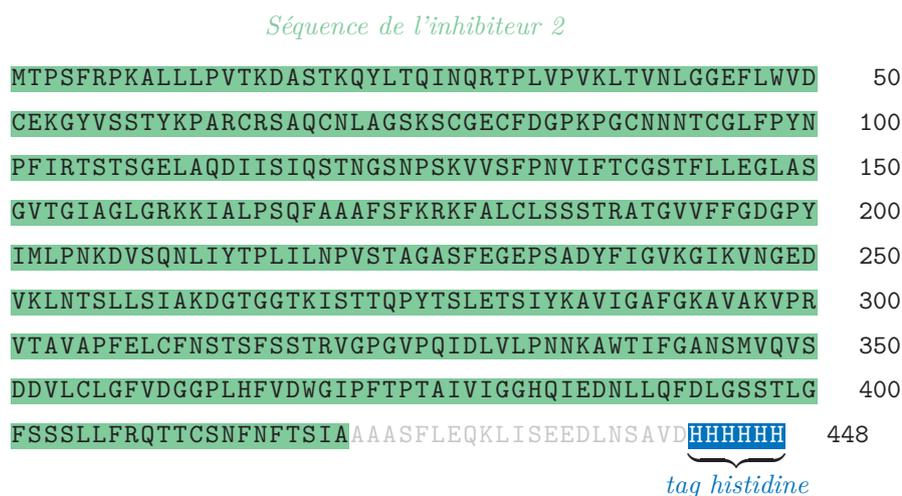
Figure 3.3 – Séquence protéique de l'inhibiteur n° 2 dans le vecteur pPICZ α B.

Figure 3.4 – Séquence protéique de l'inhibiteur n° 2 dans le vecteur pPICZB.

Séquence signal de sécrétion gp67

GRGS**MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSATVLYVLLAAAAHSFAA**ADLGSRAM 50

Séquence de l'inhibiteur 3

GTISFRPKALVLQVTKDSATHQYYTHITQRTPPVQVKVAIDLGGEFLWVD 100
CEKGFNSSTKKPVPCRSAQCNLAKSKACSTNGNPSEDVCGEFPNPFIST 150
STSGDLSQDIIYIQSTNGSRPGKVVSVPKFIFTCAPTFLLKGLTSGAVGV 200
AGLGRNKIALPSLFSAAFSFPKMAVCLSSTNGVVFFGNGPYELSSGIDV 250
SKSLTYTPLILNPVNLIGGFQGESSEYFIGVKSIVKVDGKPVSVNSSLLS 300
FDVDGNGGKISTVDPYTTLETSIYNTVVNAFVNALAVRNVHKVAAVAPF 350
SACFNAKDIGLSRAGPIVPPIEFVLQSEKVVWRVTGANSMVRVSNEVLCL 400
GFVDGGPLHFVDWGIKFTPTAIVIGGRQIEDNLLQFDLATSRLGFSSLL 450
SRQLSCSNFKFNRSTVD 467

Figure 3.5 – Séquence protéique de l'inhibiteur n° 3 dans le vecteur pAcGP67B.

Tableau 3.2 – Amorces utilisées lors du chapitre 3.

Désignation	Séquence des amorces 5' → 3'	Utilisation	
inhx15pro	ttgcc AAGCTT ctagtaagtagaagaattgaag	Clonage de l'inhibiteur n° 1 mâle dans le pET-30a	
inhx16pro	tctaa GGATCC tccccaaagctctgtgcc		
Inh1pro	tctaa GGATCC gccaaaaacagcagcatcc		
Stopinh1	acagg AAGCTT ctagtaagtagaagaattgaagtt	Clonage des inhibiteurs femelles dans le pET-30a	
CtagInh1pro	ttgcc AAGCTT gtaagtagaagaattgaagttaa		
Inh2pro	tctaa AGATCT acaccatcgttccgcccc		
Stopinh2	acagg GAGCTC gattaagcaatagatggaagttga		
CtagInh2	acagg GAGCTC gaagcaatagatggaagttgaag		
Inh3pro	tctaa AGATCT actatatcgttccgacccaaa		
Stopinh3	ttgcc AAGCTT ctaatcaacggtggatctgtt	Clonage dans le pET-39b	
CtagInh3	ttgcc AAGCTT atcaacggtggatctgttga		
Inh2pro39	tctaa CCATGG cgaccaccatcgttccgcccc		
Inh3pro39	tctaa CCATGG cgactatatcgttccgacccaaa	Clonage dans le système <i>Pichia</i> , vecteur pPICZB	
Inh1_pPICZB_f	aa GGTAAC atg gcttctcattctctttc		Clonage dans le système <i>Pichia</i> dans le vecteur pPICZaB, avec la séquence signal des inhibiteurs
Inh1_pPICZB_R	tctaa GCGGCC gcgtaagtagaagaattgaagtga		
Inh1PIC sens	tctaa CTGCAG gagccaaaacagcagcatccc		
Inh1PIC rev	tgcaac GCGGCC gcgtaagtagaagaattgaagtga		
Inh2PIC sens	tctaa CTGCAG gaacacctcgttccgcccc		
Inh2PIC rev	tgcaac GCGGCC gcagcaaaagatggaagtgaag		
Inh3PIC sens	tctaa CTGCAG gaactatatcgttccgacccaaa		
Inh3PIC rev	tgcaac GCGGCC gcatcaacgggtggtctgttga		
Inh1PIC xho	tctaa CTGCAG atg gccaaaaacagcagcattc		
Inh1PIC rev	tgcaac GCGGCC gcgtaagtagaagaattgaagtga		
Inh2PIC xho	tctaa CTCGAG atg acaccatcgttccgcc		
Inh2PIC rev	tgcaac GCGGCC gcagcaaaagatggaagtgaag		
Inh3PIC xho	tctaa CTCGAG atg actatatcgttccgacccc		
Inh3PIC rev	tgcaac GCGGCC catcaacgggtggatctgttga		
Inh1_pAcGP67B_f	tctaa GGATCC gccaaaaacagcagcat		
Inh1_pAcGP67B_R	tctaa GCGGCC ctagtaagtagaagaagaatt-gaagttga		
Inh2_pAcGP67B_f	tctaa CCATGG ga acaccatcgttccgc		
Inh2_pAcGP67B_R	tctaa GCGGCC ttaagcaatagatggaagttga		
Inh3_pAcGP67B_f	tctaa CCATGG gaactatatcgttccgacccaaa		
Inh3_pAcGP67B_R	tctaa GCGGCC ctaatcaacgggtggatctgtt		

3.2.3 Culture et production protéique

Les cultures **bactériennes** sont réalisées en milieu LB et ensemencées à partir d'une pré-culture. Les cultures sont mises à incuber à 37 °C à 200 rpm ou à 30 °C dans le cas de la souche SHuffle™. Les cultures sont induites à une DO₆₀₀ de 0,8-0,9 à 16 °C pour le pET-30a ou à 20 °C/28 °C pour le pET-39b. L'inducteur utilisé est l'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Euromedex) à 0,25 mM pour le pET-30a, à 1 mM pour le pET-39b et les constructions en souche ArcticExpress™ et à 0,40 mM pour les constructions en souche SHuffle™.

La culture des **levures** est réalisée en erlenmeyer bafflé, permettant une meilleure oxygénation, ou en plaques de 48 puits pour le criblage d'expression des clones. Lors des extractions d'ADN ou pour l'obtention de cellules électrocompétentes, la souche X33 est cultivée en milieu YPD. La production de protéines est décrite dans le manuel d'expression en *P. pastoris* fourni par la firme Invitrogen, avec l'utilisation de milieux de culture spécifiques à l'expression protéique. Une colonie issue des transformations est dans un premier temps cultivée en milieu BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium* : 1% d'extrait de levure, 2 % de peptone, 100 mM de tampon phosphate potassium pH 6,0, 1,34 % de *Yeast Nitrogen Base*, 4.10⁻⁵ % de biotine et 1 % de glycérol), à 28 °C, sous agitation à 300 rpm. Après avoir atteint une DO₆₀₀ comprise entre 2 et 6, la culture est centrifugée (10 min, 2000 g) et le culot ressuspendu avec le milieu d'induction BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium* : composition de base identique au milieu BMGY avec 0,5 % de méthanol à la place du glycérol). Lors de cette étape la DO₆₀₀ est amenée à 1. Toutes les 24 h, du méthanol est ajouté à une concentration finale de 0,5 %. Les cultures sont prélevées à des temps différents puis centrifugées (10 min, 2000 g). Selon le vecteur utilisé, le surnageant peut être analysé sur SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) ou en western blot. Les cellules sont récupérées et lysées selon le protocole ci-dessous (Section 3.2.4, page 72). Les surnageants protéiques obtenus peuvent être concentrés à l'aide d'unité d'ultrafiltration (Seuil de coupure de 10 000 kDa, Vivaspin, Sartorius) ou par précipitation au sulfate d'ammonium à 90 %. Dans ce dernier cas, le précipitat est dialysé dans le tampon approprié à l'étape suivante (comme une purification).

La co-transfection et la culture des **cellules d'insectes** ont été réalisées sur la plateforme de l'IGBMC. Les baculovirus recombinants sont générés par co-transfection du vecteur recombinant (2 µg) et de l'ADN viral (linearized BD BaculoGold™ DNA, BD Biosciences) dans des cellules d'insectes. Le gène d'intérêt est placé à la place de la polyédrine, protéine fortement exprimée par le virus mais non indispensable au cycle de multiplication. L'étape suivante correspond à une phase d'amplification dans le but d'obtenir un titrage important en virus. L'infection des cellules d'insectes va entraîner l'expression du promoteur fort codant pour la polyédrine et ainsi la production de la protéine d'intérêt. Les constructions en vecteur pAcSG ont été produites en plaque 6 puits de 5 ml, celles en pAcGP67B dans un volume de 50 ml. Le comptage des cellules est effectué par l'appareil de comptage Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom).

3.2.4 Préparation des protéines solubles

En système **bactérien**, deux techniques de lyse cellulaire ont été utilisées : la première utilisant la sonication, la seconde utilisant un tampon de lyse. Ainsi, après centrifugation (15 min, 13 000 g) de la culture bactérienne, le culot est :

- soit resuspendu dans le tampon approprié (tampon d'équilibration dans le cas d'une

purification) puis soniqué (sonicateur Branson Digital Sonifer; deux cycles de 60 secondes comprenant 15 secondes d'ultrason)

- soit lysé par l'utilisation d'un tampon de lyse (formulation commerciale de lyse bactérienne (CelLytic™B 1X, Sigma), benzonase (50 U/ml), lysozyme (0,2 mg/ml), inhibiteurs de protéases (EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail, Roche) complété avec le tampon adéquat). La suspension est agitée pendant 30 min à température ambiante.

Les protéines solubles sont récupérées dans le surnageant après centrifugation (15 min, 13 000 g). Le culot de lyse contenant les protéines insolubles, sous forme de corps d'inclusion, est conservé pour une utilisation ultérieure (Section 3.2.5, page 72).

Dans le cas de la production en **pET-39b**, une étape précédente à la lyse du culot est effectuée. Il s'agit de la récupération de la fraction périplasmique qui s'effectue selon le protocole suivant :

- Le culot de culture est resuspendu dans un tampon contenant du 30 mM de Tris pH 8, 20 % de saccharose et 1 mM d'EDTA.
- Après agitation pendant 10 min, à température ambiante, la solution est centrifugée (10 min, 10 000 g) et le culot ressuspendu dans 5 mM de $MgSO_4$ froid.
- Après agitation pendant 10 min à 4 °C, la suspension est de nouveau centrifugée (10 min, 10 000 g).

La fraction périplasmique est contenue dans le surnageant.

En **système levure** et lors de l'utilisation des constructions en vecteur pPICZαB, le milieu de culture est récupéré, contenant potentiellement les protéines d'intérêt sécrétées. Afin de vérifier si les protéines exprimées ne sont pas dans le compartiment intracellulaire et pour les constructions dans le vecteur pPIZB, les levures sont lysées par l'utilisation d'un tampon de lyse (CelLytic Buffer Y, Sigma) couplée à une lyse mécanique (billes en verre). Le lysat est centrifugé (15 min, 13 000 g) et le surnageant récupéré.

Les **cellules d'insectes** sont décrochées à l'aide d'un grattoir ou par tapotements puis centrifugées 10 min à 1 000 g. Les étapes suivantes sont valables uniquement dans le cas d'une infection à partir des constructions dans le vecteur pAcSG. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 10 % afin de supprimer l'histidine présent dans le milieu de culture. Plusieurs techniques de lyse ont été testées au cours de ces travaux :

- Lyse par sonification : 6 cycles de 5 secondes à puissance élevée (sonicateur Biotruptor® Next Gen, Diagenode).
- Lyse par l'utilisation d'un tampon de lyse (25 mM de Tris-HCl pH 8, 1 M de NaCl, 50 mM de glucose, 10 mM d'EDTA, 0,2 % de Tween20, 0,2 % de NP40 [Wang et al., 2003]).
- Lyse par succession de phases de congélation et décongélation.

Le lysat est centrifugé (10 min, 13 000 g) et les différentes fractions sont analysées.

3.2.5 Préparation des protéines insolubles et renaturation

La production protéique en système bactérien peut conduire à l'expression de protéines insolubles, sous forme de corps d'inclusion. Ces protéines sont présentes dans le culot de lyse. Ce dernier est dans un premier temps nettoyé afin de supprimer les protéines contaminantes et les restes de parois cellulaires. Les tampons suivants, basés sur le protocole du kit iFOLD™ Protein Refolding System (Novagen) sont utilisés :

- 2 cycles de lavage (10 ml par gramme de culot) avec le tampon 1X cell resuspension buffer (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 1 mM de TCEP, 0,5 mM d'EDTA, 5 %

de glycerol, pH 8).

- 2 cycles avec le tampon 1X IB wash buffer (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 1 mM de TCEP, 0,5 mM d'EDTA, 5 % de glycerol, and 1 % de Triton X-100, pH 8).

Les corps d'inclusion nettoyés sont ensuite solubilisés par resuspension du culot dans un tampon à base d'urée (50 mM de sodium phosphate, 0,3 M de NaCl, 8 M d'urée, pH 8). Après centrifugation (20 min, 13 000 g), le surnageant contenant les protéines d'intérêt est récupéré.

Afin d'éliminer l'urée et de permettre la renaturation des protéines, plusieurs méthodes ont été utilisées :

- un changement de tampon par dialyse, à 4 °C, soit par palier afin de supprimer progressivement l'urée, soit directement contre un tampon sans urée.
- une renaturation sur colonne d'affinité au nickel, avec un suivi de la densité optique (chromatographie automatisé, système Akta FPLC, GE Healthcare). Pour cela les corps d'inclusion sont fixés sur la colonne puis un gradient d'urée de 8 M à 0 M est réalisé à un débit de 0,5 ml/min, sur 100 ml. Les protéines sont éluées sous l'action de l'imidazole.
- l'utilisation de composés connus pour favoriser la renaturation des protéines. Les étapes sont les suivantes :
 - 10 mg de protéines sous forme de corps d'inclusion sont mises en suspension par pendant 1 h avec une résine d'affinité au nickel (GE Healthcare).
 - Après centrifugation (5 min, 5 000 g), la résine est soumise à deux cycles de nettoyage de 10 min chacun ; le premier avec un tampon contenant du 50 mM de Tris pH 8,3, 300 mM de NaCl, 1 % de Triton X100, 10 mM de β -mercaptoethanol, le second avec le tampon suivant : 100 mM de Tris pH 8, 300 mM de NaCl, 5 mM de β -cyclodextrine.
 - Un dernier lavage est effectué pendant 16 h à 4 °C avec du 100 mM de Tris pH 8, 300 mM de NaCl, 1 mM de glutathion réduit, 1 mM de glutathion oxydé, 5 mM de β -cyclodextrine.
 - La résine est lavée trois fois avec un tampon de lavage (100 mM de Tris pH 8, 300 mM de NaCl) puis éluée (100 mM de Tris, pH 8, 400 mM de NaCl, 400 mM d'imidazole).

Un échantillon est récupéré à l'issue de chaque étape en vue d'être analysé.

Le produit N-voy (Expedeon) a également été utilisé. Il a la particularité de contenir des polymères glucidiques pouvant permettre l'augmentation de la solubilité et la stabilité des protéines tout en évitant l'agrégation.

3.2.6 Purification de protéines

L'ensemble des constructions (hormis celle dans le vecteur pAcGP67B) présente un tag histine permettant la purification des protéines par chromatographie d'affinité immobilisée d'ion en métal (IMAC). Des colonnes de type Hi-trap chelating (GE Healthcare) sont utilisées selon un protocole classique de purification. Le débit choisi lors de ces essais est de 1 ml/min. Les tampons utilisés après optimisation sont les suivants :

- Tampon d'équilibration : 50 mM de sodium phosphate, 0,3 M de NaCl, 25 mM d'imidazole, pH 7,4.
- Tampon de lavage : 50 mM de sodium phosphate, 0,3 M de NaCl, 100 mM d'imidazole, pH 7,4.

- Tampon d'élution : 50 mM de sodium phosphate, 0,3 M de NaCl, 500 mM d'imidazole, pH 7,4.

En conditions dénaturantes, les tampons précédents sont utilisés avec l'ajout d'urée à 8 M. Les éluats sont prélevés par fraction de 500 μ l, ainsi E1 correspond aux 500 premiers μ l de tampon d'élution passés sur la colonne.

Pour les tests analytiques, une purification d'affinité au nickel est effectuée avec les colonnes HIS-Select[®]Spin (Sigma). En conditions natives, les tampons utilisés sont les suivants :

- Tampon d'équilibration : 50 mM de sodium phosphate, 0,3 M de NaCl, pH 8.
- Tampon de lavage : 50 mM de sodium phosphate, 0,3 M de NaCl, 5 mM d'imidazole, pH 8.
- Tampon d'élution : 50 mM de sodium phosphate, 0,3 M de NaCl, 250 mM d'imidazole, pH 8.

En conditions dénaturantes, les tampons précédents sont utilisés avec l'ajout d'urée à 8 M.

La présence dans les constructions en pET-30a d'un S-tag a également permis la mise en place de purifications basées sur des interactions protéines-protéines. La résine utilisée est de type S-protein agarose (Novagen). Le culot de culture est resuspendu dans le tampon d'équilibration et les protéines solubles sont déposées sur colonne. Après plusieurs lavages, les protéines sont éluées. Les tampons utilisés sont les suivants :

- Tampon d'équilibration/lavage 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,1 % de Triton X-100.
- Tampon d'élution 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,1 % de Triton X-100, 3 M de MgCl₂.

En colonne ou *en batch* et/ou avec suivi de la densité optique, plusieurs résines ont été testées dans le cadre de la purification en résine dite epoxy. Le principe consiste à fixer des anticorps anti-inhibiteurs (Section 3.2.8, page 75) sur la résine puis de mettre en contact un surnageant de lyse. Les inhibiteurs seront ainsi fixés spécifiquement aux anticorps. Après lavage, les protéines fixées sont éluées puis les fractions analysées. Les protocoles utilisés lors de ces purifications sont basés sur les protocoles commerciaux des résines utilisées : Vivapure Epoxy Protein Coupling Kit (Vivascience), CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare), Protifity[™]Epoxyde resin (Biorad), HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare).

3.2.7 Analyses des protéines

Les protéines sont analysées sur des gels SDS-PAGE à 12 % en condition dénaturante [Laemmli et al., 1970]. Après migration dans un tampon TGS 1X (25 mM de Tris pH 8,3, 192 mM de glycine, 0,1 % de SDS), les protéines sont révélées par une solution de coloration (PageBlue[™], Fermentas), puis dans certains cas d'une coloration au nitrate d'argent (PlusOne Silver Staining, GE Healthcare). Les marqueurs de tailles utilisés sont le SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low range (Biorad) et le PageRuler[™]Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). Les protéines recombinantes présentant un site de coupure à l'entérokinase sont digérées par cette même enzyme (Enterokinase from bovine intestine, Sigma) afin de confirmer la production de la protéine d'intérêt. La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford, en utilisant la BSA (bovine serum albumin) comme standard [Bradford, 1976].

Les protéines sont également analysées par western blots (Section 3.2.8.3, page 76).

3.2.8 Immunodétection

3.2.8.1 Production des anticorps primaires

L'analyse fine des séquences protéiques nous a permis de définir une vingtaine de séquences peptidiques envisageables pour la production d'anticorps polyclonaux (plate-forme d'outils de bioinformatique de l'Université de Madrid, <http://imed.med.ucm.es>). La distinction d'un inhibiteur par rapport à un autre n'a pas été retenue comme critère de sélection du peptide, et le choix s'est porté sur un peptide ciblant une région commune aux trois protéines. Un peptide a été pu être défini en vue d'une production d'anticorps polyclonaux, après vérification par BLASTp qu'il ne présente pas de similarités fortes avec des protéines présentes dans les banques de données. Ce peptide, de séquence « VKFTPTAVVIGG », se situe dans la région C-terminale des protéines et est représenté sous la forme d'une séquence logo (Figure 3.6, page 75), permettant ainsi de visualiser parfaitement les homologues de séquences entre les trois inhibiteurs.

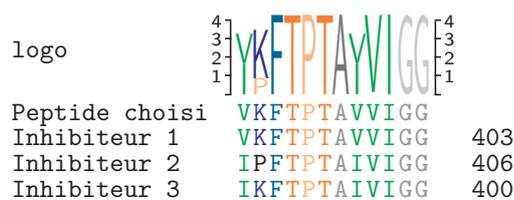


Figure 3.6 – Alignement des trois inhibiteurs.

La synthèse peptide a été réalisée sur la plate forme de l'IGBMC (Illkirch, France) avec l'ajout d'une cystéine pour le couplage à l'ovalbumine. Ce dernier a été effectué par l'ajout de 2 mg du produit Imject® Maleimide activated ovalbumine (Thermo Fisher Scientific) à de 2 mg de peptide. L'ensemble est incubé pendant 2 h à température ambiante puis est dialysé contre du TBS 1X (20 mM de Tris pH 7,4, 150 mM de NaCl). Un dépôt sur SDS-PAGE (Figure 3.7, page 76) montre une différence de poids moléculaire entre ovalbumine seule et le peptide couplé à l'ovalbumine et confirme le couplage. L'injection de la protéine *carrier* couplée (500 µg à 1 mg/ml) a été effectuée sur la plate-forme d'anticorps polyclonaux de l'IGMBC, sur deux lapins femelles de souche Néo-Zélandais blanc (lapins n° 2770 et n° 2771), selon leur protocole de production d'anticorps polyclonaux. Seul le sérum du lapin n° 2771 a servi de base pour les anticorps polyclonaux.

3.2.8.2 Purification des anticorps primaires

Une purification des anticorps a été réalisée afin d'éliminer les anticorps dirigés éventuellement contre des protéines de *E. coli* (le caractère coprophage du lapin entraînant la présence d'anticorps anti-*E. coli*) et donc de disposer d'anticorps les plus spécifiques. Cette purification est basée selon le protocole délivré avec la résine d'immobilisation des protéines : CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare). Globalement, une culture bactérienne de 500 mL d'*E. coli* est lysée par l'utilisation d'un tampon de lyse (CelLytic™B, Sigma). Les protéines récupérées sont ensuite fixées sur la résine, après incubation avec celle-ci. Une étape

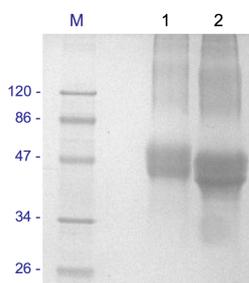


Figure 3.7 – SDS-PAGE montrant le couplage effectif du peptide et de l'ovalbumine.
 M : marqueur de taille : SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low range, Biorad.
 1 : dépôt de 10 μg d'ovalbumine seule. 2 : dépôt de 10 μg du peptide couplé à l'ovalbumine.

de saturation des groupements amines est effectuée avec le passage de plusieurs tampons définis dans le protocole. La dernière étape consiste à déposer sur la colonne les anticorps à purifier. Les fractions en sortie de colonne correspondent aux anticorps purifiés.

3.2.8.3 Western-Blot

Après migration des protéines, le gel SDS-PAGE est immergé pendant 15 min dans le tampon cathode (25 mM de Tris pH 9,4, 40mM de Glycine, 10 % de Méthanol). Une membrane en PVDF (polyfluorure de vinylidène, Amersham Hybond™, GE Healthcare) est placée 15 s dans le méthanol, rincée pendant 2 min dans l'eau puis incubée 5 min dans le tampon anode II (25 mM de Tris pH 10,4, 10 % de Méthanol). Le système de transfert utilisé est un système semi-sec. La membrane et le gel sont disposés selon la figure 3.8 (page 76) et recouverts de couches de papier Whatman 3M imbibées dans les différents tampons (le tampon anode I : 300 mM de Tris pH 10,4, 10 % de Méthanol). Le transfert est réalisé à 60 mA pendant 40 minutes.

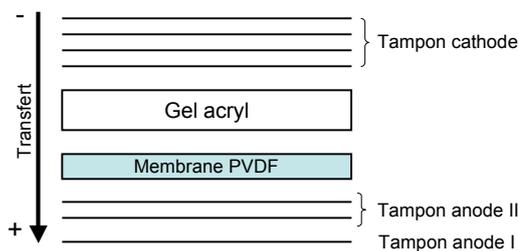


Figure 3.8 – Schéma représentatif du transfert des protéines sur membrane.

Les différentes étapes de l'immunodétection se déroulent selon le protocole suivant :

- Séchage de la membrane au méthanol
- Étape de saturation par incubation de la membrane pendant 30 min dans une solution de TBS Tween 0,5 %, lait 4 %.

- Incubation de l'anticorps primaire dilué au 1/5 000 pendant 1 h dans une solution de TBS Tween 0,5 %, lait 0,5 %.
 - Etapes de lavage composées d'un cycle de 15 min et de trois cycles de 5 min dans du TBS Tween 0,5 %.
 - Incubation de l'anticorps secondaire (Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase, Sigma) dilué au 1/10 000 pendant 45 min dans une solution de TBS Tween 0,5 %, lait 0,5 %.
 - Etapes de lavage composées de deux cycles de 10 min et deux cycles de 5 min dans du TBS Tween 0,5 %.
 - Rinçage à l'eau.
 - Dépôt sur la membrane d'un réactif de détection de la peroxidase par luminescence (WEST-one™, INtRON).
 - Exposition sur des films autoradiographiques (Kodak).
- L'ensemble de ces étapes se déroule à température ambiante.

Lors des criblages en système *P. pastoris*, des analyses en *slot blot* sont effectuées selon le montage et le protocole de branchement du système Bio-Dot SF de Biorad. 200 μ l de surnageant sont déposés par puits et rincés à plusieurs reprises au TBS 1X. L'immunodétection se déroule selon les mêmes conditions que le western blot.

3.2.9 Analyse en spectrométrie de masse

Certains échantillons ont nécessité l'analyse des protéines par spectrométrie de masse. Pour cela, la préparation des échantillons est effectuée dans un environnement sans kératine, avec les précautions d'usage pour cette utilisation. Les analyses sont effectuées au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (UMR 7178, CNRS-UdS) pour les échantillons provenant de *E. coli* et sur la plate-forme de l'IGMBC pour les échantillons de *P. pastoris*. Après digestion trypsique et analyses en MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time-Of-Flight*), les peptides obtenus sont comparés avec les séquences des inhibiteurs et les bases de données du NIH.

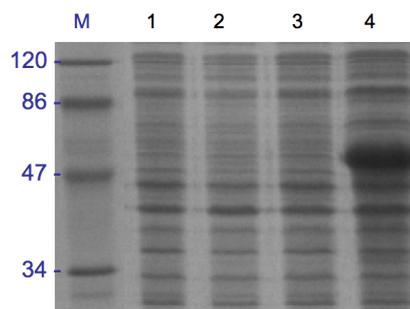
3.3 Résultats

3.3.1 Premiers essais en système bactérien

Le système de production en *E. coli* présente des avantages certains : expression rapide, rendements importants, faible coût [Demain and Vaishnav, 2009], faisant de ce système un des plus couramment utilisés pour la production de protéines recombinantes. Historiquement, les premiers travaux ont été effectués sur l'inhibiteur n° 1 mâle, les trois homologues n'étant à cette époque pas encore mis en évidence. Une partie de l'optimisation s'est donc effectuée à partir de ce clone en BL21(DE3), dont la protéine exprimée présente une masse moléculaire théorique de 49,8 kDa.

3.3.1.1 Travaux sur les protéines solubles

Les premiers essais de culture ont permis de valider la surexpression de l'inhibiteur n° 1 comme le souligne la présence d'une bande à une taille proche de celle attendue en piste 4 de la figure 3.9a (page 78).



(a) SDS-PAGE présentant les protéines totales de culture non induite (ni) et induite *over-night* ($i_{O/N}$) du pEt-30a et du pEt-30a contenant l'insert de l'inhibiteur n° 1 mâle. 1 et 2 : culture ni et $i_{O/N}$ du pEt-30a. 3 et 4 : culture ni et $i_{O/N}$ du pEt-30a contenant l'insert de l'inhibiteur n° 1 mâle.

Figure 3.9 – SDS-PAGE d'échantillons de culture de l'inhibiteur n° 1 mâle dans le pET-30a.

Après sonication, les protéines intracellulaires sont purifiées par chromatographie d'affinité. Le profil protéique d'un éluat est présenté en figure 3.10a (page 80). On y constate la présence de trois bandes protéiques, représentées par les lettres *a*, *b* et *c*, avec des tailles proches de celle attendue. On peut considérer que des différences entre la taille théorique et la taille observée sur gel sont dues à un pI élevé ou à une composition importante en acides aminés hydrophobes [Satoh and Fujii, 1988]. Les protéines observées ne sont pas observables dans les éluats issus d'une purification effectuée sur une souche ne contenant que le vecteur pET-30a, laissant ainsi supposer que ces protéines résultent directement de l'induction à l'IPTG. Chaque portion de gel contenant les bandes *a*, *b* et *c* a été analysée en spectro-

métrie de masse. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.3 (page 79). Les pourcentages d'identité proches voir égaux à 100 % confortent la présence des inhibiteurs. Le nombre de peptide unique et le pourcentage de recouvrement correspondant à l'inhibiteur n° 1 est le plus important dans la fraction *c*. Un raisonnement identique laisse supposer que la bande *b* correspond à une chaperone. Ces protéines ont pour but d'assister d'autres protéines dans leur maturation, en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat. En outre, ces protéines sont fortement exprimées dans des conditions de stress (comme une exposition à des hautes température). Leur présence peut donc s'expliquer du fait de la surexpression protéique. La bande *a* correspond à une formyltransferase.

Tableau 3.3 – Résultats issus de l'analyse en MALDI-TOF des bandes protéiques obtenues sur gel SDS-PAGE en pET-30a.

Piste analysée	Nom de la protéine	Pourcentage d'identité protéique	Nombre de peptide unique	Pourcentage de recouvrement	Pourcentage total du spectre
E4 a	Inhibiteur n° 1	100 %	10	28,1 %	1,3 %
	Chaperone ^a	100 %	23	68,4 %	8,5 %
	Formyltransferase ^b	100 %	37	60,6 %	9,8 %
E4 b	Inhibiteur n° 1	100 %	6	18,9 %	0,7 %
	Chaperone ^a	100 %	42	30,1 %	88,7 %
E4 c	Inhibiteur n° 1	100 %	26	56,5 %	6,1 %
	Chaperone ^a	100 %	29	75,5 %	16,1 %

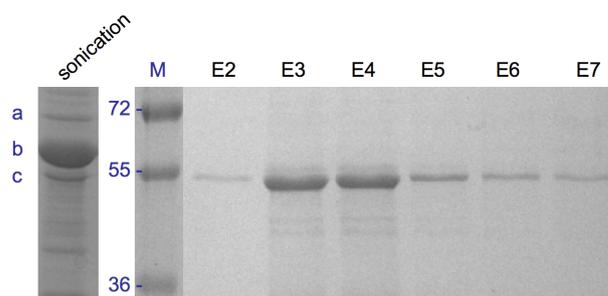
a. UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose formyltransferase - *Escherichia coli* (strain ATCC8739/DSM1576)

b. Cell division protease ftsH - *Escherichia coli* (strain K12)

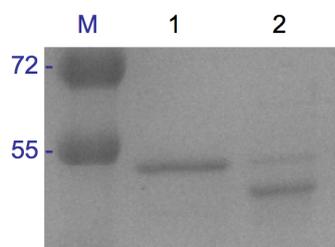
Des protéines intracellulaires, récupérées après l'utilisation de tampons de lyse sur un culot bactérien (Section 3.2.4, page 72), ont été purifiées par chromatographie d'affinité. Les dépôts des éluats sur SDS-PAGE (Figure 3.10a, page 80) montrent la purification d'une protéine à une bande inférieure à 50 kDa. La taille est identique à celle de la bande *c* décrit précédemment par la technique de la sonication et considérée d'après l'analyse en MALDI-TOF comme l'inhibiteur n° 1. L'action de l'entérokinase sur l'un des éluats (Figure 3.10b, page 80) permet d'ailleurs de visualiser un écart de poids moléculaire et confirme ainsi la présence de la protéine d'intérêt.

Ces résultats ont permis de définir les conditions de culture (température d'induction de 16 °C, concentration en IPTG de 0,25 mM), la méthode de lyse cellulaire ainsi que la concentration en imidazole pour les tampons de purification (Section 3.2.6, page 73).

L'utilisation d'acides aminés connus pour aider à l'amélioration de la purification (L-Arg et L-Glu) [Golovanov et al., 2004] a ainsi été testée dans un but d'optimisation de la purification ainsi que le développement de nouvelles techniques de purification avec par exemple la purification d'affinité à partir du S-tag en N-terminal.



(a) SDS-PAGE d'échantillons issus de purification en HisTrap de l'inhibiteur n° 1 à partir de protéines solubles lysées par sonication (piste *sonication*) ou par action d'un tampon de lyse (pistes E2 à E7).



(b) Action de l'entérokinase sur des éluats de purification. 1 : Eluat E7 sans entérokinase. 2 : Eluat E7 avec entérokinase

Figure 3.10 – SDS-PAGE d'échantillons issus de purification par chromatographie d'affinité.

La production d'anticorps polyclonaux a permis d'envisager l'utilisation de cet outil pour la purification des protéines solubles. La spécificité de ces anticorps et leur capacité à reconnaître les inhibiteurs ont dû dans un premier temps être confirmées. Un western blot sur des cultures non-induites (ni) et induites ($i_{O/N}$) est présenté en figure 3.11 (page 81). Un signal apparaît pour chaque échantillon pouvant être assimilé à un signal aspécifique. Un second signal apparaît, à un poids moléculaire supérieur au précédent signal, pour les cultures induites. Ce même signal est par ailleurs absent pour le vecteur pET-30a ainsi que pour les cultures non-induites. La faible intensité de signal pour l'inhibiteur n° 2 est due à une production moins importante pour cet homologue en comparaison des autres inhibiteurs. La reconnaissance des anticorps pour les inhibiteurs recombinant permet ainsi d'envisager leur utilisation dans le cadre d'une purification. Comme présenté dans la partie Matériels et Méthodes (Section 3.2.6, page 74), plusieurs résines ont été testées comme support de fixation des anticorps. Ces résines ont présenté dans tous les cas, une fixation faible de la protéine cible, à savoir les inhibiteurs de houblon. Des difficultés lors de l'élué ont également été observées et ce malgré l'utilisation de plusieurs types de tampons d'élué. Ces tampons ont eu pour but soit de modifier la force ionique (par changement de pH), soit de réduire la polarité (avec l'utilisation d'éthylenglycol à 10 % et 50 %) ou encore d'entraîner un changement de conformation des protéines fixées (urée, sel de guanidine). Seule l'utilisation de Tween® 20 (Sigma) à 0,1 % a pu permettre d'élué les protéines fixées sur la résine, mais de manière non-spécifique, rendant ainsi cette technique de purification non avantageuse malgré la spécificité des anticorps polyclonaux.

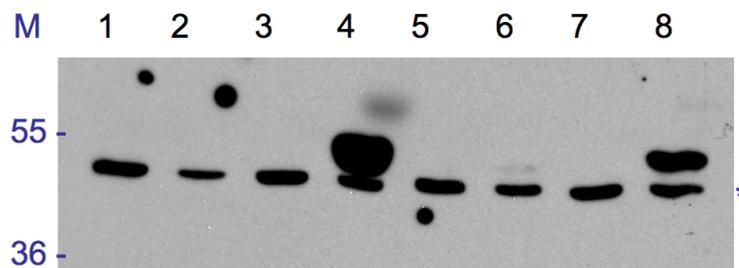


Figure 3.11 – Mise en évidence de la spécificité des polyclonaux. M : marqueur de taille. 1 et 2 : Protéines totales ni et $i_{O/N}$ du pet-30a. 3 et 4 : Protéines totales ni et $i_{O/N}$ de l'inhibiteur n° 1. 5 et 6 : Protéines totales ni et $i_{O/N}$ de l'inhibiteur n° 2. 7 et 8 : Protéines totales ni et $i_{O/N}$ de l'inhibiteur n° 3. Le symbole « * » représente les signaux aspécifiques.

3.3.1.2 Travaux sur les corps d'inclusion

Des travaux ont été effectués sur les protéines agrégées et insolubles, produites sous forme de corps d'inclusion. L'agrégation des protéines sous forme de corps d'inclusion n'implique pas nécessairement une perte d'activité biologique [De Groot and Ventura, 2006]. De plus ces protéines bénéficient le plus souvent d'une grande pureté et sont, sous cette forme, protégées de la protéolyse et des processus de dégradation [Idicula-Thomas and Balaji, 2007]. L'obtention de protéines actives à partir de corps d'inclusion se déroule en trois phases : l'isolement et la solubilisation des corps d'inclusion, la purification et enfin la renaturation des protéines sous une forme soluble et active.

Pour obtenir des protéines actives, les corps d'inclusion doivent être extraits des cellules puis les protéines solubilisées par des agents dénaturants qui font « déplier » les protéines, et enfin les ponts disulfures doivent être éliminés par l'utilisation d'agents réducteurs. Le repliement de la protéine est accompli par la suppression des agents dénaturants et réducteurs, suivi par la renaturation (*refolding*) des protéines [Demain and Vaishnav, 2009]. Cette dernière étape est la plus délicate et dans de nombreux cas, conduit à la précipitation des protéines. Afin de vérifier la bonne solubilité des protéines, des mesures de turbidité sont réalisées. Dans le cas d'une protéine précipitée, l'absorbance décroît régulièrement avec un léger pic à 280 nm. Le spectre d'une protéine soluble présente un profil différent avec un pic à 280 nm [Vincentelli et al., 2004]. Le ratio $Abs_{280\text{ nm}} / Abs_{340\text{ nm}}$, pouvant être appelé taux d'agrégation, peut être calculé et comparé aux témoins [Nomine et al., 2001]; une valeur élevée indique des protéines sous forme soluble. Les tests témoins sont effectués sur la BSA et sur les corps d'inclusion, avec l'ajout d'isopropanol lors des travaux sur les protéines précipitées. La figure 3.12 (page 82) présente les profils des spectres d'absorbance ainsi que le coefficient d'agrégation obtenu pour les corps d'inclusion dans les conditions de précipitation (isopropanol) ou de solubilité (urée). Ces tests ont été régulièrement utilisés lors du refolding.

Le changement progressif de tampon par dialyse n'a pas permis la renaturation des protéines. Celles-ci ont précipité dans les conditions testées. La renaturation sur colonne n'a pas non plus été fructueuse. Les protéines se sont révélées être faiblement fixées sur la résine d'affinité au nickel, avec une élution régulière au cours de la purification, suggérant

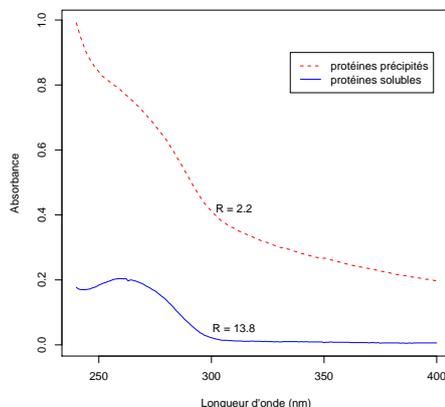
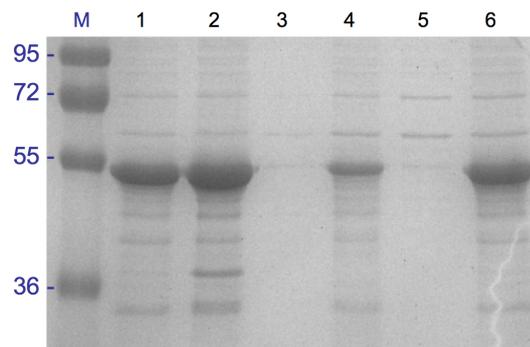


Figure 3.12 – Spectre d'absorbance des protéines sous forme précipitées et solubles.

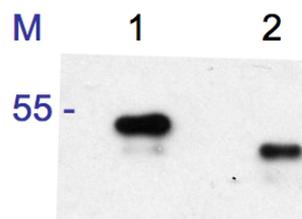
à la fois que le redéploiement sur colonne n'est pas efficace, mais également une possibilité que le tag-histidine n'est pas accessible en conditions dénaturantes. Les éluats obtenus par cette méthode ont présenté une faible quantité de protéines, jugée insuffisante pour les tests d'activités enzymatiques.

De nombreuses références bibliographiques font mention de l'ajout de composés favorisant la renaturation des protéines [Vincentelli et al., 2004, Singh and Panda, 2005, Lee et al., 2006]. Ainsi l'utilisation d'arginine à une concentration de 0,4 à 1 M peut réduire l'aggrégation des protéines et ainsi améliorer le rendement de renaturation des protéines solubilisées. Les agents réduits et oxydés du glutathion GSH/GSSG, avec des ratios allant de 3 : 1 à 1 : 1 et une concentration de 5 à 15 mM peuvent jouer un rôle similaire à celui de l'arginine [Clark, 2001]. Enfin l'utilisation de la cyclodextrine contribue au refolding pour son rôle en tant que piège à détergent. En utilisant ces composés, des essais de renaturation ont été entrepris comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes (Section 3.2.5, page 73). Les surnageants des différentes étapes ont été déposés sur gel pour analyse. Environ 5 % des protéines ont pu être éluées selon cette technique, la présence des inhibiteurs ayant été confirmée par western blot. La renaturation des inhibiteurs sous forme de corps d'inclusion est ainsi possible selon cette technique, mais avec des rendements moindres.

Dans le cas d'une dialyse contre un tampon sans urée, les protéines précipitent comme nous pouvons l'observer en figure 3.13a (page 83) dans le puit n° 3. Nous avons ainsi souhaité améliorer la dialyse et l'utilisation du N-voy, ajouté à la suspension protéique à dialyser, a montré de bons résultats. Ce produit masque les poches hydrophobes empêchant notamment les interaction avec d'autres molécules, protège et stabilise la protéine. En présence du N-voy, près de 95 % des protéines peuvent être récupérées (Figure 3.13a, puit 6). Le rendement sera d'autant plus important que la concentration en sel sera élevée, comme l'attestent les différences obtenues avec les tampons contenant 50 mM ou 300 mM de NaCl. Enfin, une détection en western blot ainsi que l'action de l'entérokinase (Figure 3.13b, page 83) confirment la présence de l'inhibiteur.



(a) Effet du N-Voy et de la concentration en NaCl sur 10 μ g de corps d'inclusion dialysés. 1 et 2 : Dépot avant dialyse des corps d'inclusion en tampon contenant 50 mM ou 300 mM de NaCl. 3 et 5 : Dépot après dialyse des corps d'inclusion en tampon contenant 50 mM ou 300 mM de NaCl, sans N-voy. 4 et 6 : Dépot après dialyse des corps d'inclusion en tampon contenant 50 mM ou 300 mM de NaCl, avec N-voy. .



(b) Action de l'entérokinase sur les corps d'inclusion issus de la dialyse contre un tampon contenant 50 mM de NaCl. 1 : Echantillon sans entérokinase. 2 : Echantillon avec entérokinase

Figure 3.13 – Résultats obtenus lors de travaux sur les corps d'inclusion.

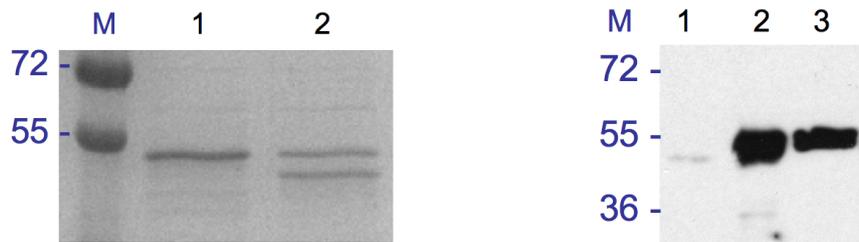
3.3.2 Utilisation d'autres systèmes de production

3.3.2.1 Utilisation des souches ArcticExpressTM, OrigamiTM2(DE3) et SHuffleTM

Les réductases présentes dans le cytoplasme d'*E. coli* gardent les cystéines sous leur forme réduite (R-SH), expliquant ainsi l'absence de formation de ponts disulfures dans ce compartiment. Des mutations sur deux gènes codant pour des réductases (*trxB* et *gor*) permettent à la souche d'*E. coli* OrigamiTM2 la formation des ponts disulfures dans le cytoplasme. Des essais sur l'inhibiteur n° 1 du plant mâle ont été effectués sans toutefois présenter une augmentation accrue de la proportion de protéines solubles récupérées.

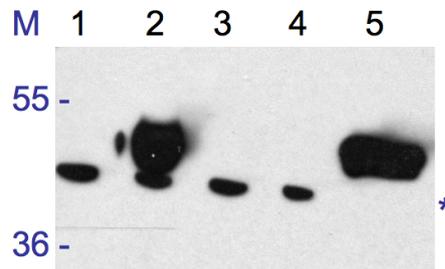
La souche SHuffleTM présente, tout comme la souche OrigamiTM2, les mutations sur deux réductases et a la particularité d'exprimer l'isomérase DsbC qui permet d'améliorer la formation des ponts disulfures et en tant que protéine chaperone, d'intervenir dans le repliement des protéines. Les inhibiteurs ont pu être surexprimés et leurs présences confirmées du fait du décalage de masse moléculaire induit pas l'action de l'entérokinase (Figure 3.14a, page 85) et en western blot (Figure 3.14b, page 85).

Comme nous l'avons vu, l'expression de protéines hétérologues dans *E. coli* peut entraîner une production de protéines incorrectement foldées, générant des agrégats de protéines inactives sous forme de corps d'inclusion. Utiliser une température plus faible pour l'induction, afin de ralentir le métabolisme est une stratégie pour augmenter la récupération de protéines solubles. Cependant, les protéines chaperones d'*E. coli*, qui facilitent la bonne conformation des protéines, perdent leur activité à des faibles températures. La souche ArcticExpressTM exprime deux protéines chaperones, Cpn10 et Cpn60, actives à des faibles températures et ayant montré une activité de refolding. Leur utilisation pourrait augmenter le rendement des protéines recombinantes solubles comme mentionné pour certaines protéines [Joseph and Andreotti, 2008, Hartinger et al., 2010]. Le western blot présenté à la figure 3.14c (page 85) confirme la surexpression protéique (pistes 1 à 4) et les purifications en chromatographie d'affinité permettent d'éluer notre protéine d'intérêt (piste 5 du western blot). Néanmoins, on ne constate pas une nette amélioration en rendement protéique par rapport aux cultures en BL21(DE3).



(a) Digestion par entérokinase d'un éluat de purification d'affinité de l'inhibiteur n° 1 produit dans SHuffle™. 1 : Eluat sans entérokinase. 2 : Eluat avec entérokinase.

(b) Western blot effectué sur des échantillons protéiques issus de culture induite, non induite et d'éluat de purification de l'inhibiteur n° 1 dans la souche SHuffle. 1 et 2 : culture ni et i_{O/N} de l'inhibiteur n° 1. 3 : Eluat.



(c) Western blot effectué sur des échantillons issus de la production de l'inhibiteur n° 1 produit dans la souche ArcticExpress™. 1 et 2 : ni et i_{O/N} de l'inhibiteur n° 1. 2 et 3 : ni et i_{O/N} du vecteur pET-30a dans la souche Arctic. 5 : Eluat de l'inhibiteur n° 1 après purification en HIS-select, dépôt de 2,5µg. Le symbole « * » représente les signaux aspécifiques.

Figure 3.14 – Résultats de la production des protéines issues de constructions dans les souches ArcticExpress™ et SHuffle™.

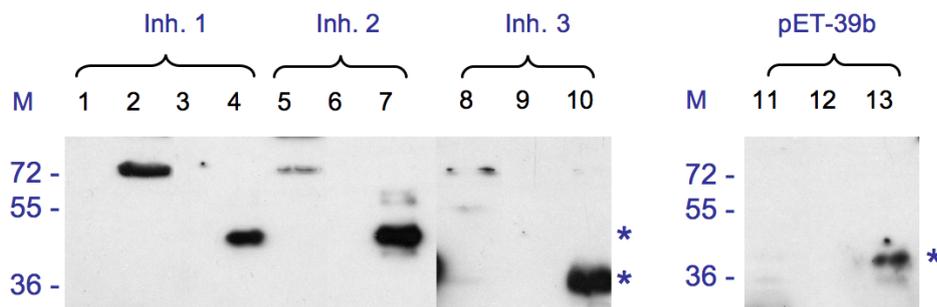
3.3.2.2 Utilisation du pET-39b

L'amélioration de la solubilité des protéines recombinantes dans *E. coli* implique communément le changement de certaines conditions d'expression. Ainsi la réduction de la température, le changement de souche *E. coli*, les conditions d'induction ou la co-expression avec des protéines chaperones peuvent montrer des améliorations [Esposito and Chatterjee, 2006]. Cependant ces essais peuvent s'avérer infructueux ou les améliorations considérées comme minimales. Une autre stratégie consiste à coupler la protéine d'intérêt avec une autre protéine dite de fusion, et ce dans le but d'améliorer la solubilité de la protéine. Dans certains cas, ces protéines améliorent également l'efficacité de la purification protéique, comme dans le cas des tag-GST (Glutathione-S-transferase) [Esposito and Chatterjee, 2006].

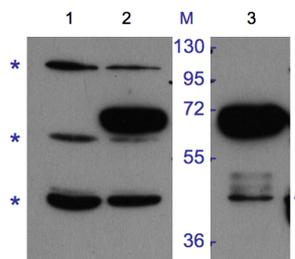
Contrairement au cytoplasme, le périplasma d'*E. coli* est un environnement oxydant qui contient des enzymes catalysant la formation et l'isomérisation des ponts disulfures. Ces derniers contribuent à la stabilité des protéines et dans de nombreux cas, sont nécessaires à leurs activités catalytiques [Choi and Lee, 2004]. Diriger les protéines hétérologues vers le périplasma peut ainsi être une stratégie visant à obtenir des protéines correctement foldées. Le principe est de fusionner le gène d'intérêt à une séquence signal pouvant permettre à la protéine d'intérêt d'être dirigée dans le périplasma. Dans le cas du pET-39b, la séquence signal est celle de la DsbA (*disulfide oxidoreductase A*). Cette association peut permettre d'améliorer la solubilité et de faciliter la formation des ponts disulfures. L'utilisation de ce vecteur a montré de bons résultats avec une lipase du champignon *Pseudozyma antarctica* particulièrement difficile à exprimer [Xu et al., 2008]. La localisation prédite des inhibiteurs, dans la matrice extracellulaire, conforte également cette approche.

Des cultures ont été réalisées en volume de 100 ml, avec une température d'induction de 28 °C. Les échantillons des protéines totales issues des cultures non-induites et induites *overnight* sont déposés en SDS-PAGE et montrent la présence d'une protéine de poids moléculaire de l'ordre de 72 kDa, absente dans les échantillons issus des cultures non-induites ou de la construction en vecteur pET-39b. La présence du peptide signal de la *DsbA* explique le poids moléculaire des protéines recombinantes, 71,6 kDa, 72,0 kDa et 71,9 kDa respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3. Les fractions périplasmiques récupérées ne montrent pas de bande protéique à la taille attendue en SDS-PAGE. Un western blot a donc été entrepris (Figure 3.15a, page 87). Des signaux positifs sont observés dans les échantillons de cultures induites (avec une plus faible intensité pour les inhibiteurs n° 2 et n° 3), mais ne se retrouvent ni dans les fractions périplasmiques ni dans les protéines solubles. Une fraction du culot de lyse, c'est-à-dire les protéines insolubles, a été analysée en western blot (Figure 3.15b, page 87). Un signal est nettement visible, à une taille identique de celui de l'induit *overnight* (puit n° 2). Il est à noter que ces protéines insolubles ne peuvent être solubilisées dans l'urée. Les cultures induites à une température de 20 °C et l'utilisation de volumes de culture plus importants n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats.

Les protéines produites dans le vecteur pET-39 ne semblent donc pas être dirigées vers le périplasma. La capacité de ce vecteur à améliorer la solubilité et la formation des ponts disulfures n'est donc pas assurée. Par ailleurs, la quantité protéique obtenue est faible en comparaison d'autres constructions et une purification par chromatographie d'affinité ne permet pas d'obtenir des quantités de protéines suffisantes pour la réalisation de tests enzymatiques.



(a) Western Blot. M : marqueur de taille. 1 et 2 : ni et $i_{O/N}$; 3 : fraction périplasmique; 4 : protéines solubles. Les puits suivants présentent l' $i_{O/N}$, la fraction périplasmique et les protéines solubles des échantillons pour l'inhibiteur n° 2, l'inhibiteur n° 3 et le pET-39b.



(b) Western blot de la fraction insoluble. M : marqueur de taille. 1 et 2 : ni et $i_{O/N}$; 3 : fraction du culot de lyse.

Figure 3.15 – Western blot des échantillons des inhibiteurs produits dans le vecteur pET-39b. Les symboles « * » représentent les signaux aspécifiques

3.3.3 Production en système *Pichia pastoris*

Les levures sont couramment utilisées pour produire les protéines recombinantes en particulier en cas de nécessité des glycosylations. L'avantage majeur des levures par rapport à *E. coli* est que ces microorganismes sont capables de produire des ponts disulfures et de permettre les modifications post-traductionnelles telle que la glycosylation des protéines. Elles présentent également de nombreux avantages tels que des rendements importants, des souches recombinantes stables, une haute productivité, un coût peu important, une intégration possible de multiples copies dans l'ADN chromosomique des transformants, une sécrétion faible en protéines endogènes [Demain and Vaishnav, 2009]. Néanmoins, il est important de préciser qu'un certain nombre de protéines requiert, pour une bonne conformation, des protéines chaperones, protéines que *P. pastoris* est incapable de produire [Demain and Vaishnav, 2009].

Cette partie présente les différentes stratégies abordées dans le cadre de la production dans ce système d'expression ainsi que les résultats correspondants. Lors de ces travaux, plusieurs transformations ont été effectuées afin de pouvoir traiter un nombre important de clones. Selon les constructions, plus de 100 clones ont ainsi été analysés, par western blots, dot blots et/ou purifications d'affinité.

3.3.3.1 Production intracellulaire avec le vecteur pPICZB

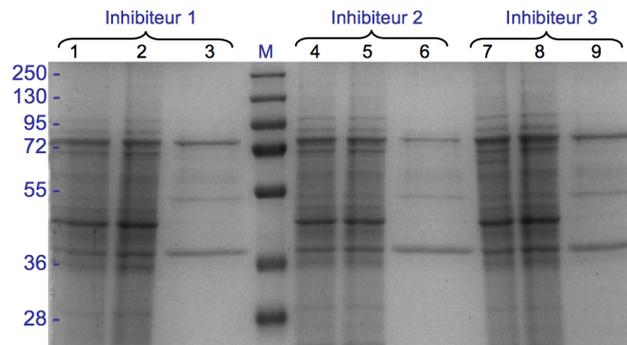
Les transformations dans la souche X33 de *P. pastoris* ont conduit à l'obtention de plusieurs dizaines de clones sur gélose. Les premiers essais ont été effectués sur des colonies ayant montré une résistance à une concentration en antibiotique de 2000 $\mu\text{g/ml}$, alors que la résistance basale pour l'obtention de recombinants est de 100 $\mu\text{g/ml}$. Ceci permet de mettre en évidence les transformants multicopies pouvant potentiellement générer une production plus importante de protéines [Sunga et al., 2008]. Les protéines intracellulaires après 72 h d'induction sont déposées en SDS-PAGE. L'absence de bandes surexprimées à la taille attendue hors glycosylation (47,6 kDa, 47,8 kDa et 47,6 kDa, respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3) ont conduit à la réalisation de purifications par chromatographie d'affinité et la visualisation par immunodétection des protéines intracellulaires. Les figures 3.16a et 3.16b (page 89) présentent les résultats obtenus respectivement en SDS-PAGE et en western blot. Trois bandes sont visibles en coloration sur gel aux tailles de 80 kDa, 55 kDa et 36 kDa (pistes 3, 6 et 9 de la figure 3.16a). Ces profils sont identiques à ceux obtenus par purification des protéines intracellulaires issues d'une culture du vecteur pPICZB (données non montrées). En western blot, aucun signal n'est détecté dans les éluats (pistes 3, 6 et 9 de la figure 3.16b). Ces résultats suggèrent l'absence d'inhibiteur dans ces échantillons.

Des cultures en volume de 250 ml sont effectuées sur un des clones des constructions en pPICZB. Après lyse des cellules, les protéines du surnageant sont purifiées sur colonne d'affinité (HisTrap). Comme le montre la figure 3.16c (page 89), une protéine du clone 2 de l'inhibiteur n° 2 est éluee avec une grande pureté à une taille d'environ 37 kDa. Cette protéine est également isolée pour le clone 3 de l'inhibiteur n° 1. En western blot, ces éluats ne réagissent pas avec les anticorps polyclonaux. La pureté de ces échantillons nous a amené à réaliser une analyse en spectrométrie de masse. Suite à cette analyse, 42 peptides ont été trouvés, dont 15 présentant une homologie de séquence avec les bases de données de peptides, avec au minimum 40 % de recouvrement. Deux protéines sont identifiées :

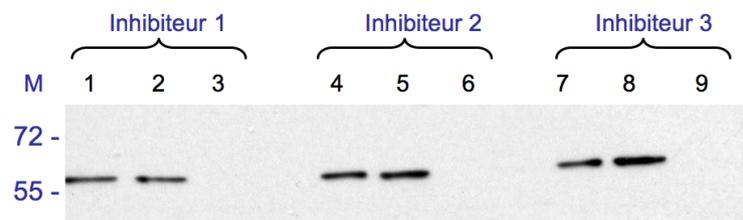
- XP_002491382, Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III [*Pichia pastoris* GS115], d'une taille de 37,0 kDa

- CAY69102, Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III [*Pichia pastoris GS115*], d'une taille de 37,0 kDa.

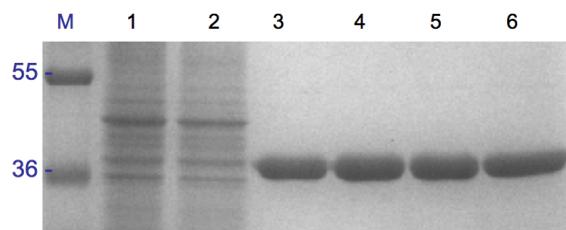
Cette surexpression est explicable par l'induction au méthonol des levures et ne correspond ainsi pas aux inhibiteurs.



(a) SDS-PAGE d'échantillons issus de purifications de différents clones dans le vecteur pPICZB. Puits 1, 4 et 7 : échantillons déposés sur la colonne. Puits 2, 5 et 8 : échantillons récupérés en sortie de colonne. Puits 3, 6 et 9 : éluats



(b) Western blot d'échantillons issus de purifications de différents clones dans le vecteur pPICZB. Puits 1, 4 et 7 : échantillons déposés sur la colonne. Puits 2, 5 et 8 : échantillons récupérés en sortie de colonne. Puits 3, 6 et 9 : éluats.



(c) SDS-PAGE d'échantillons issus d'une purification de l'inhibiteur n° 2 dans le vecteur pPICZB en culture de 250mL. 1 : surnageant de lyse. 2 : flow through de la colonne 3 à 6 : éluats successifs.

Figure 3.16 – SDS-PAGE et western blot des résultats des inhibiteurs dans le vecteur pPICZB.

3.3.3.2 Production dans le milieu extracellulaire

La taille théorique des protéines dans le vecteur pPICZ α B est de 47,5 kDa, 47,6 kDa et 47,5 kDa respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3. Après vérification de la présence de l'insert par PCR, 119, 58 et 54 clones respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3 ont ainsi pu être exploités. Les clones sont criblés par slot blot. Ceux montrant un signal positif (ou supérieur au bruit de fond) sont mis en culture de 100 ml. Les protéines présentées dans les surnageants de culture sont précipitées au sulfate d'ammonium. Les culots de culture sont lysés afin de récupérer les protéines intracellulaires. Ces deux échantillons protéiques sont soumis à une purification par chromatographie d'affinité. Les protéines dans le milieu extracellulaire ne présentent aucun signal en western blot. Malgré le peptide signal de sécrétion codé par le vecteur pPICZ α B, les inhibiteurs ne sont pas sécrétés et restent localisés dans le compartiment intracellulaire. La construction de l'inhibiteur n° 1 en pPICZB avec la séquence native de la protéine, n'a pas non plus permis l'expression de l'inhibiteur.

3.3.4 Production en cellules d'insectes

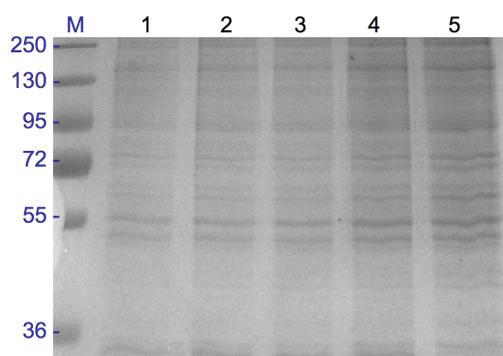
Les cellules d'insectes sont capables de modifications post-traductionnelles complexes dont les N- et O-glycosylations. L'environnement cytoplasmique des cellules d'insectes permet une bonne conformation des protéines et la formation des ponts disulfures. Le vecteur le plus couramment utilisé pour l'expression recombinante de protéines est le baculovirus, et notamment le virus de la polyedrose d'*Autographa californica* (nuclear polyhedrosis virus : NPV). Le virus contient un gène codant la protéine polyédrique qui est exprimée en temps normal en quantité élevée mais qui n'est pas nécessaire à la réplication du virus. Le gène à cloner est placé sous le contrôle du promoteur de la polyédrique, permettant ainsi l'expression de protéines hétérologues jusqu'à 30 % des protéines cellulaires [Demain and Vaishnav, 2009].

Les constructions entreprises en cellules d'insectes ont été réalisées soit dans le vecteur pAcSG soit dans le vecteur pAcGP67B, ce dernier permettant la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire. L'augmentation du diamètre des cellules d'insectes a été utilisée pour prédire la productivité de la culture. Il existe en effet une corrélation proportionnelle entre l'augmentation de la taille des cellules et la concentration en protéine d'intérêt [Palomares et al., 2001]. La sensibilité aux protéases de nos protéines recombinantes étant inconnue, les conditions optimales de production et du temps de récolte ont été déterminées.

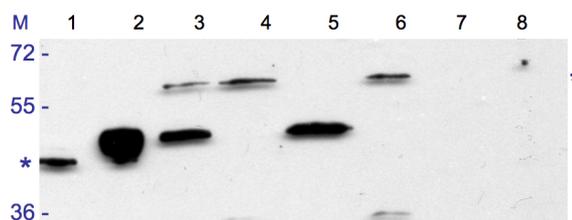
3.3.4.1 Production avec le vecteur pAcSG His

$3 \cdot 10^5$ cellules d'insectes ont été analysées pour chaque inhibiteur. L'analyse comprend la récupération des protéines totales, la lyse cellulaire par sonication ainsi que les protéines insolubles. Ces dépôts sur SDS-PAGE n'ont pas permis de détecter une surproduction protéique. La figure 3.17a (page 91) présente les fractions solubles des constructions des inhibiteurs ainsi que les témoins négatifs après lyse. Les analyses en western blot ont conduit aux résultats présentés à la figure 3.17b (page 91) pour l'inhibiteur n° 1. On observe pour les protéines totales un signal à une taille proche de celle du témoin position $i_{O/N}$ de l'inhibiteur n° 1 dans BL21(DE3). Ce signal est absent dans l'échantillon de protéines solubles mais il apparaît dans celui des protéines insolubles. Les résultats présentés pour l'inhibiteur n° 1 sont similaires pour les deux autres protéines. Ces résultats montrent l'absence de production sous

forme soluble de nos protéines d'intérêt. Une purification d'affinité au nickel a néanmoins été effectuée permettant ainsi de concentrer spécifiquement notre protéine d'intérêt. Les échantillons déposés sur gel ne permettent pas de visualiser un signal pouvant correspondre à l'inhibiteur. Diverses techniques de lyse (décrites dans à la section 3.2.4, page 72) ont été utilisées afin de s'affranchir de la possibilité d'une mauvaise extraction des protéines recombinantes. La lyse des cellules a donc été effectuée avec l'utilisation d'un tampon de lyse ou par la succession de phases de congélation/décongélation. Ces différentes techniques de lyse n'ont pas permis d'améliorer la récupération des protéines solubles.



(a) SDS-PAGE des surnageants de lyse des inhibiteurs en cellules d'insectes. 1 et 3 : Protéines solubles de l'inhibiteur n° 1, l'inhibiteur n° 2 et l'inhibiteur n° 3. 4 : Protéines solubles de cellules d'insectes non infectées. 5 : Protéines solubles de cellules d'insectes transfectées par la souche sauvage du baculovirus.



(b) Western blot d'échantillons issus de baculovirus. 1 et 2 : Témoins ni et $i_{O/N}$ de l'inhibiteur n° 1 dans BL21(DE3). 3 à 5 : Protéines totales, surnageant de lyse et culot de lyse. 6 à 8 : Flow-through, fraction de lavage et éluat d'une purification d'affinité au nickel. Les symboles « * » représentent les signaux aspécifiques.

Figure 3.17 – SDS-PAGE et western blot obtenus lors des travaux en cellules d'insectes avec le vecteur pAcSG His.

La formation d'agrégats intracellulaires due aux protéines mal conformées et à d'autres protéines est parfois causée par une expression tardive du cycle d'infection. Dans certains cas, une récupération à des temps plus courts après infection peut aider [Demain and Vaisnav, 2009]. L'observation microscopique des cultures (permettant de déterminer le stade d'infection des virus) et le prélèvement précoce des cellules tendent à écarter dans notre cas cette hypothèse.

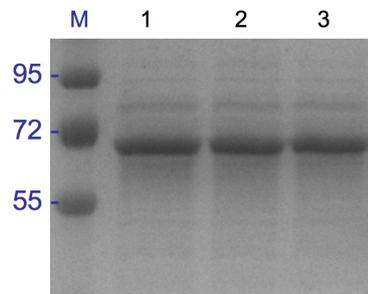
3.3.4.2 Production avec le vecteur pAcGP67B

Suite aux résultats précédents sur le vecteur pAcSG His, de nouveaux travaux ont été entrepris avec le vecteur pAcGP67B. Ce vecteur a la particularité de contenir une séquence signal (gp67) permettant de forcer la sécrétion des protéines recombinantes. Il a d'ailleurs été montré que la sécrétion d'une protéine de plante dans le système baculovirus est améliorée lorsque le peptide signal a pour origine celui d'un insecte plutôt que celui de la plante [Tessier et al., 1991].

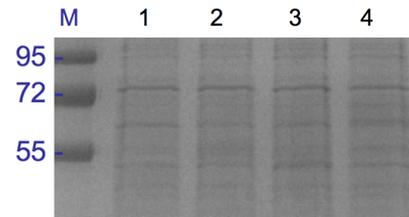
La figure 3.18a (page 93) présente le profil protéique des surnageants de culture des trois inhibiteurs après 72 h. On y distingue dans chaque échantillon la présence d'une protéine à la taille de 70 Kda. Le profil est identique après 24 h et 48 h. En western blot, un signal apparaît à la taille de 50 kDa (*données non montrées*), à une position supérieure au témoin *E. coli* d'une culture induite *over-night*, laissant supposer de possibles modifications post-traductionnelles sur ces protéines recombinantes, telles que des glycosylations. Du fait de l'absence de signal en western blot pour la protéine à la taille de 70 kDa visualisée sur SDS-PAGE, cette protéine majoritaire dans les surnageants de cultures est probablement une protéine endogène, des cellules d'insectes ou du virus. Malgré cette présence, des tests d'inhibition seront néanmoins entrepris en chapitre 4 (Section 4.3.2.1, page 106).

Dans une optique d'amélioration de la production protéique, de nouvelles cultures ont été effectuées en diminuant la quantité de virus inoculé (d'un facteur 60). En effet, dans le cas d'une concentration virale trop importante, les ressources métaboliques cellulaires sont réduites avant que le plus haut niveau d'expression protéique soit atteint. La figure 3.18b (page 93) présente les extraits protéines des surnageants de culture des trois inhibiteurs ainsi qu'un témoin négatif, c'est-à-dire une souche sauvage inoculée en cellules d'insectes. On y constate la faible concentration de la protéine contaminante à la taille 70 kDa, permettant ainsi de confirmer l'hypothèse précédente quant à l'origine virale de cette bande. Le profil en SDS-PAGE ne permet néanmoins pas de visualiser une surexpression protéique et la purification de ces extraits sera envisagée dans le paragraphe suivant. En western blot (Figure 3.18c, page 93), trois signaux apparaissent à une taille proche de 55 kDa, c'est-à-dire une taille supérieure à celle attendue pour les inhibiteurs.

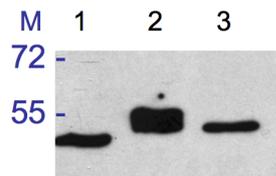
Un western blot est réalisé sur des échantillons de l'inhibiteur n° 2 au temps 24 h, 48 h et 96 h ainsi que la souche sauvage (Figure 3.18d, page 93). Aucun signal n'apparaît pour les échantillons de la souche sauvage et pour le temps 24 h. Les temps 72 h et 96 h montrent un signal positif. Ces résultats sont cohérents avec une production absente ou faible lors du début de l'infection. Les observations microscopiques viennent également conforter ces résultats. Le stade 24 h présente des cellules de tailles *normales* régulières, comme on peut le constater en figure 3.19a (page 93). Au stade 72 h et 96 h, les cellules observées présentent des tailles plus importantes, signe d'une infection virale et un début de lyse est observable au stade 96 h (Figures 3.19b et 3.19c, page 93).



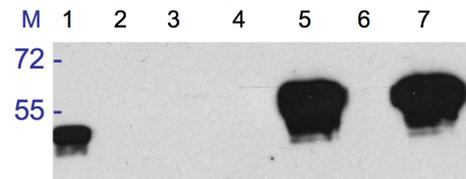
(a) SDS-PAGE. 1 et 3 : 10 μ l de surnageant de culture ont été déposés respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3.



(b) SDS-PAGE. 1 à 3 : 10 μ l de surnageant de culture ont été déposés respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3. 4 : témoin négatif

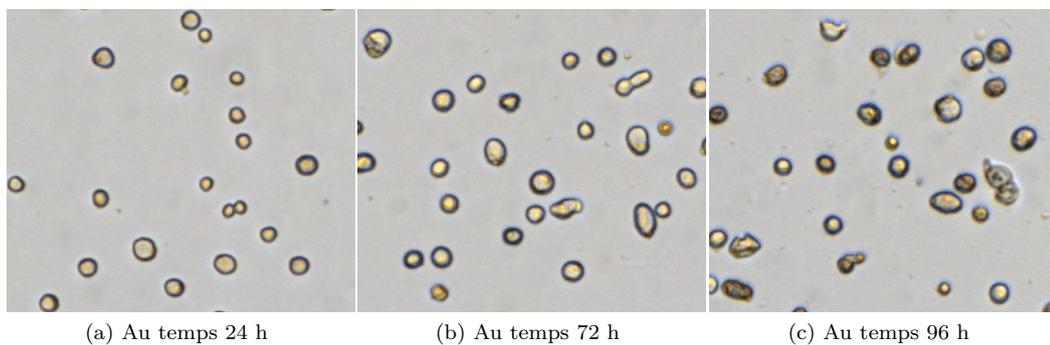


(c) Western blot. 1 à 3 : dépôt de 15 μ l de surnageant de culture, respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3.



(d) Western blot. 1 : culture induite *over-night*. Dépôt de 15 μ l de surnageants de culture de l'inhibiteur n° 2 (puits 3, 5 et 7) et de la souche sauvage (puits 2, 4 et 6), au temps 24 h, 48 h et 96 h.

Figure 3.18 – SDS-PAGE et western blots effectués sur des échantillons issus de surnageants de culture lors de constructions en vecteur pAcGP67B.



(a) Au temps 24 h

(b) Au temps 72 h

(c) Au temps 96 h

Figure 3.19 – Observations microscopiques (grossissement x 2000) de cellules d'insectes après infection virale.

3.4 Discussion

Ce chapitre a traité de la production et de la purification des inhibiteurs de houblon. L'expression des protéines recombinantes a montré des difficultés et malgré l'utilisation du système *P. pastoris* et celui en cellules d'insectes, seules les productions hétérologues dans *E. coli* ont permis l'obtention de protéines recombinantes purifiées. Une comparaison de la production hétérologue des inhibiteurs de xylanases sera l'objet de cette discussion.

Plusieurs inhibiteurs de xylanases ont été produits dans le système *E. coli* et *P. pastoris* dans des conditions similaires aux conditions testées dans ce chapitre. Dans *E. coli*, XIP-RI a été exprimée avec succès dans la souche BL21(DE3) [Takahashi-Ando et al., 2007], de même que TAXI-I [Fierens et al., 2003] notamment dans le pET-30a [Weng et al., 2010]. Ces inhibiteurs recombinants ont présenté des activités similaires aux protéines natives, laissant présager une inhibition possible lors de la mise en place des tests enzymatiques avec nos inhibiteurs et ce malgré l'absence de glycosylation dans ce système d'expression. XIP-I a également été exprimée dans *E. coli* [Elliott et al., 2002] et s'est révélée fonctionnelle. Néanmoins cette protéine a présenté une faible stabilité, conduisant à une rapide perte d'activité. L'absence de glycosylation en serait la cause [Elliott et al., 2002]. En effet cette modification post-traductionnelle joue un rôle important dans beaucoup de processus biologiques comme la stabilisation des protéines [Yon-Kahn and Herve, 2005].

Dans le système *P. pastoris*, TAXI-I [Fierens et al., 2004], TAXI-IB/IIA/IIB [Raedschelders et al., 2005], TLXI [Fierens et al., 2007], XIP-I [Durand et al., 2005] ont été clonés dans le vecteur pPICZ α avec succès. Les résultats des tests d'inhibition se sont également montrés similaires aux protéines natives. Malgré cette possibilité d'expression dans ce système, nos études n'ont pas pu permettre d'aboutir à l'expression de clones exprimant les inhibiteurs de houblon. Dans le vecteur pPICZ α B, les inhibiteurs sont restés localisés dans le compartiment intracellulaire, pouvant signifier que ces protéines n'ont pas été glycosylées.

Pour l'heure, aucune des XEGIPs décrites dans la littérature n'a été produite sous une forme recombinante. Seuls Shang et collaborateurs font référence à l'absence de glycosylation dans *E. coli* pouvant en partie expliquer la difficulté à exprimer l'EDGP [Shang et al., 2005].

Les anticorps polyclonaux ont permis la mise en place de techniques validant la présence ou l'absence des inhibiteurs lors de la surexpression protéique et ce pour les trois inhibiteurs. Néanmoins leur utilisation dans le cadre de purification n'a pas pu aboutir aux résultats escomptés. Les échecs rencontrés peuvent s'expliquer par une faible accessibilité à l'épitope. Une analyse de sa position au sein de la structure tridimensionnelle prédite de l'inhibiteur n° 1 (résultats similaires pour l'inhibiteur n° 2 et l'inhibiteur n° 3) montre une faible disponibilité en surface de ce peptide, avec une partie du peptide cachée à l'intérieur de la structure protéique. La figure 3.20 (page 95) présente la position de l'épitope dans la structure de l'inhibiteur n° 1 (en rouge) et relate cette hypothèse. Cela peut occasionner une difficulté pour la reconnaissance de l'épitope par les anticorps. La création des structures tridimensionnelles prédites sera explicitée lors du chapitre 4 (Section 4.2.7, page 103). À l'heure actuelle, aucune étude sur les XEGIPs ne fait mention de travaux entre ces protéines et des techniques basées sur l'immunologie. Des anticorps polyclonaux ont été produits pour un inhibiteur de type XIP (OsXIP, isolé sur *Oryza sativa*) à partir d'un peptide. Ce dernier présente une grande disponibilité du fait de sa position en surface sur une hélice alpha [Tokunaga et al., 2008]. Ils ont ainsi permis la localisation spatiale des inhibiteurs. La production

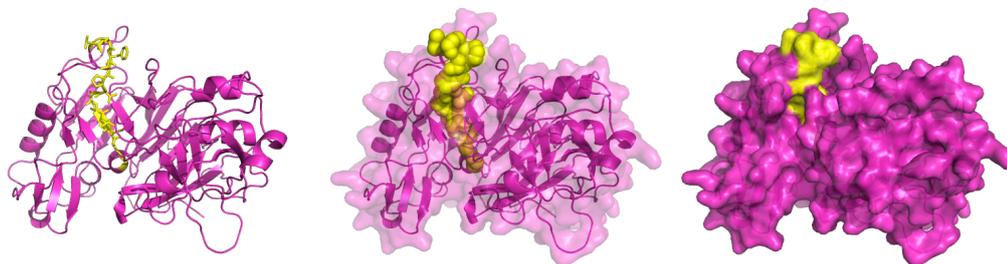


Figure 3.20 – Position de l'épitope des anticorps polyclonaux de l'inhibiteur n° 1. Les différentes vues permettent de se rendre compte de la faible disponibilité à l'épitope reconnu par les anticorps polyclonaux.

d'anticorps polyclonaux pour les inhibiteurs de type TAXI, XIP et TLXI s'est réalisée à partir des protéines natives purifiées et ont permis la purification des inhibiteurs ainsi que l'identification d'homologues d'inhibiteurs de xylanases [Beaugrand et al., 2006].

Après la production des trois inhibiteurs, il s'agit de les caractériser en testant leur activité d'inhibition sur des enzymes de classes différentes. La recherche d'enzymes cibles, l'importance de la glycosylation ou les effets de la présence de motifs de structures moléculaires en comparaison avec les données publiées feront partie des points discutés lors du chapitre 4.

INTERACTIONS ENTRE LES XEGIPs DU HOUBLON ET DES ENZYMES CIBLES

Sommaire

4.1	Introduction	99
4.2	Matériels et méthodes	100
4.2.1	Enzymes utilisées	100
4.2.2	Substrats utilisés et mesure de l'activité enzymatique	100
4.2.3	Tests d'inhibition enzymatique	101
4.2.4	GH12 de <i>F. graminearum</i>	101
4.2.4.1	Clonage des GH12	101
4.2.4.2	Culture et purification des GH12	102
4.2.4.3	Caractérisation des GH12 et spécificité de substrat	102
4.2.5	Immunodétection	102
4.2.6	Outils statistiques	103
4.2.7	Bioinformatique	103
4.3	Résultats	104
4.3.1	Résultats des tests d'inhibition à partir des inhibiteurs produits dans <i>E. coli</i> et dans le vecteur pAcSG en cellules d'insectes	104
4.3.2	Résultats des tests d'inhibition à partir des inhibiteurs dans le vecteur pAcGP67B en cellules d'insectes	106
4.3.2.1	Tests préliminaires sur le Viscozyme	106
4.3.2.2	Confirmation des essais d'inhibition après optimisation des cultures en pAcGP67B et travaux sur les surnageants de culture de <i>F. graminearum</i>	108
4.3.2.3	Tests d'inhibition sur les surnageants de culture de <i>F. graminearum</i>	111
4.3.3	Etude et caractérisations de GH12 de <i>F. graminearum</i>	114
4.3.3.1	Clonage des quatre GH12 de <i>F. graminearum</i>	114
4.3.3.2	Caractérisation des quatre GH12 de <i>F. graminearum</i>	117
4.3.3.3	Interaction entre les inhibiteurs et les enzymes de <i>F. graminearum</i>	118
4.4	Discussion	120
4.4.1	Protéines recombinantes produites dans <i>E. coli</i> et absence de capacité inhibitrice	120
4.4.2	Résidus impliqués dans l'inhibition des XEGIPs de houblon	122
4.4.3	Capacité d'inhibition et enzymes cibles	125
4.4.4	Les GH12 de <i>F. graminearum</i> , cibles potentielles des XEGIPs	125
4.4.5	XEGIPs de houblon et défense de la plante	126

4.1 Introduction

Les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence l'existence de trois gènes codant des inhibiteurs de xyloglucanases. Différents systèmes de production ont permis d'obtenir des protéines recombinantes en vue de tests d'activité. La mise en contact de nos inhibiteurs de houblon avec des enzymes cibles a pour but de valider la fonction inhibitrice de nos protéines d'intérêt.

Des publications relatent la capacité des XEGIPs à inhiber les XEGs c'est-à-dire les *xyloglucan-specific endo- β -1,4-endo-glucanase* d'origine fongique appartenant à la famille des GH12 [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005]. Cette famille d'enzymes, d'après la classification de la base de données CAZy, présente les activités suivantes : endoglucanase (EC 3.2.1.4) ; xyloglucan hydrolase (EC 3.2.1.151) ; β -1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73) ; xyloglucan endo-transglycosylase (EC 2.4.1.207). Seules trois XEGIPs sont caractérisées (AAN87262 chez la tomate [Qin et al., 2003], BAA03413 chez la carotte [Shang et al., 2005] et AAX81588 [Naqvi et al., 2005] chez le tabac ornemental) et montrent des interactions avec des GH12 d'*Aspergillus aculeatus* et une absence d'inhibition avec des enzymes des classes GH10 et GH11. La XEGIP de la tomate a pu inhiber une endoglucanase (GH12) de *Cladosporium fulvum* mais pas celle de *Trichoderma longibrachiatum*, ni une xyloglucane endo-transglycosylase de plante (LeXET2, GH16) [Qin, 2003, Qin et al., 2003]. Aucune autre étude ne fait référence à l'inhibition de GH12 issues d'autres champignons ou d'origine bactérienne. À notre connaissance, aucun test d'inhibition avec d'autres enzymes fongiques ayant une activité xyloglucanase (EC 3.2.1.151) telles que les enzymes de la famille des GH5, GH16, GH26, GH44 et GH74 n'est répertorié dans la bibliographie. La recherche d'enzymes cibles qui fait l'objet de ce chapitre est peu documentée à ce jour.

Les tests d'inhibition positifs relatés par les précédentes publications [Qin et al., 2003, Shang et al., 2005, Naqvi et al., 2005] sur les XEGIPs nous ont conduit à tester les inhibiteurs du houblon sur des GH12 d'*A. aculeatus*, commercialisées sous la forme d'un cocktail enzymatique (Viscozyme). De plus, dans le cadre de l'étude des interactions plantes/champignons, les inhibiteurs ont été mis en contact avec des surnageants de culture de *F. graminearum*, contenant des CWDEs en quantité importante et pouvant potentiellement être inhibées par les protéines de houblon. La recherche d'enzymes cibles et les nombreux travaux effectués au sein du laboratoire sur *F. graminearum* ont conduit au clonage et à la production de quatre GH12, jusqu'alors non étudiées. La caractérisation de ces enzymes a ainsi été effectuée et sera présentée dans ce chapitre. Ces enzymes ont été testées lors de mises en contact avec les inhibiteurs de houblon. Par ailleurs, du fait des homologies avec les protéines de type TAXI, des essais ont été effectués avec les GH11 et également les GH10 de *F. graminearum*. Des analyses de bioinformatiques comprenant l'étude des structures tridimensionnelles prédites des inhibiteurs et des GH12 de *F. graminearum* viendront appuyer les résultats expérimentaux.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Enzymes utilisées

Dans ce chapitre, différentes enzymes et sources d'enzymes ont été utilisées pour tester les inhibiteurs.

Une GH10 (nommée XylD) et une GH11 (XylB) produites au laboratoire ont été utilisées lors des premiers tests d'inhibition. Ces enzymes ont fait l'objet d'études poussées et sont référencées sous les numéros d'accèsion XP_391480 [Pollet et al., 2009a] et XM_383800 [Beliën et al., 2005]. L'expression, la production et la purification de ces enzymes sont basées sur la publication de Carapito et collaborateurs [Carapito et al., 2009].

Un cocktail enzymatique commercial (Viscozyme L[®], Novozyme) produit à partir *A. aculeatus* et connu pour la présence d'enzymes ayant une activité xyloglucanase a été utilisé. Ces enzymes, après purification selon Pauly et collaborateurs [Pauly et al., 1999], sont utilisées par l'ensemble des chercheurs travaillant sur les XEGIPs [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005, Scarafoni et al., 2010].

Des études protéomiques effectuées au laboratoire sur des surnageants de culture de *F. graminearum* ont permis de disposer de CWDEs ainsi que des caractéristiques de celles-ci. Brièvement, le protocole utilisé est le suivant : le champignon est mis en culture avec plusieurs substrats (milieu minimum et parois de houblon, son, rafles de maïs et glucose) et les surnageants de culture sont récupérés. Après dépôt (l'équivalent de 800 μ l) sur gel SDS-PAGE, les pistes sont analysées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et la présence, tant qualitative que quantitative, des divers enzymes de classe GH est analysée. Dans le cadre des interactions inhibiteurs / enzymes, ces surnageants de culture ont été utilisés.

La recherche d'enzymes cibles des inhibiteurs a conduit le projet au clonage de GH12 de *F. graminearum* et fait l'objet d'une analyse plus développée dans la section 4.2.4 (page 101).

4.2.2 Substrats utilisés et mesure de l'activité enzymatique

Plusieurs substrats insolubles (de type AZCL) ont été utilisés : AZCL-Xyloglucane, AZCL-Xylane, AZCL-HE-Cellulose (Megazyme). Ils sont employés lors des tests enzymatiques à une concentration de 0,25 % finale. L'hydrolyse de ces substrats conduit à la libération de fragments solubles de xyloglucane auxquels sont attachés des groupements AZO, mesurables au spectrophotomètre à une densité optique d'une longueur d'onde de 595 nm (DO_{595 nm}, bleu).

Les substrats solubles utilisés sont les suivants : Xyloglucane (Megazyme), Xyloglucane de tamarin, β -D-glucane d'orge, Xylane d'avoine, CMC, Lichénane de *Cetraria islandica* (Sigma). Les réactions sont réalisées à une concentration en substrat de 0,5 % final. Les cinétiques enzymatiques sont réalisées comme suit : 100 μ l du mélange « enzyme + substrat » sont prélevés, placés 10 min à ébullition puis congelés. Les produits formés sont dosés par la méthode DNS, qui permet de doser les sucres réducteurs libérés [Miller, 1959]. 500 μ l de réactif (acide dinitrosalicylique 1 %, NaOH 1 %, Na₂SO₃ 0,05 %, sodium potassium tartrate 30 %) sont ajoutés à 80 μ l de milieu réactionnel. Le mélange est chauffé à 95 °C pendant 10 min et une mesure de DO_{550 nm} est effectuée après refroidissement. Une gamme de glucose

permet de déterminer la correspondance de la densité optique en équivalent glucose.

4.2.3 Tests d'inhibition enzymatique

Les enzymes et les inhibiteurs recombinants sont dialysés contre 50 mM d'acétate de sodium, à pH 6, pendant 16 h et à 4 °C. Les échantillons sont éventuellement concentrés à l'aide d'unité d'ultrafiltration (seuil de coupure : 10 000 kDa, Vivaspin, Sartorius). Dans ce cas, le filtrat est récupéré et sera utilisé comme « contrôle tampon » lors des tests d'inhibition enzymatique. Les protéines dialysées ont été systématiquement déposées sur SDS-PAGE (et dans certains cas analysées en western blots) afin de valider leur présence et écarter les possibilités de précipitation pendant la dialyse.

Les inhibiteurs sont incubés avec les enzymes durant 30 min, à un ratio inhibiteur : enzyme supérieur ou égal à 1 : 1, dans les cas où un tel ratio a pu être calculé. Le substrat correspondant et le tampon de réaction (50 mM d'acétate de sodium, pH 6) sont ensuite ajoutés pour un volume final de 1 ml. Le mélange réactionnel est placé à température ambiante (sauf indication contraire). Des contrôles négatifs (absence d'enzyme et d'inhibiteur, enzyme ou inhibiteur seul, enzyme et inhibiteur dénaturée, filtrat d'ultrafiltration des inhibiteurs concentrés) ont été effectués pour l'ensemble des tests d'inhibition réalisés.

4.2.4 GH12 de *F. graminearum*

Quatre enzymes appartenant putativement à la famille des GH12 ont fait l'objet d'une étude plus approfondie : FG03029, FG05851, FG07892 et FG11037 (numéro d'accension des bases de données de *F. graminearum*, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj-fusarium>).

4.2.4.1 Clonage des GH12

F. graminearum a été isolé à partir de houblon malade et identifié par CABI Bioscience (Royaume-Uni). L'inoculation (10^4 conidies) est effectuée sur milieu minimum [Mitchell et al., 1997] complémenté par une unique source de carbone à 10 g/l : parois de houblon, son, bouleau, carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma) ou xylane de bouleau (Sigma). Les traitements des parois de houblon ont été effectués à partir de 10 g d'un mélange fragmenté au blender (feuilles, tiges et cônes). Après addition de 80 ml d'ammoniaque à 20 %, les parois sont portées à ébullition pendant 1 h. L'ammoniaque est enlevée par évaporation, pendant 16 h, à 70 °C. Les substrats, tels que le son ou le bouleau, ont également été prétraités selon cette méthode. La CMC et le xylane n'ont pas subi de traitement.

Les cultures sont réalisées dans des flacons de culture cellulaire de 75 cm² contenant 50 ml de milieu, à 25 °C. Après croissance mycélienne (6 à 15 jours), les cultures sont prélevées et le mycélium récupéré. Les extractions d'ARN et la synthèse de cDNA sont décrites dans la section 2.2.2 (page 38) du chapitre 2. Les PCRs ont été effectuées avec les amorces décrites dans le tableau 4.1 (page 102). Les produits de PCR sont digérés par *Bsa*I pour FG03029, FG07892 et FG11037 et par *Bsm*BI pour FG05851. Le vecteur pET-30a, utilisé comme vecteur d'expression, est digéré par *Nco*I et *Eco*RI. La ligation effectuée, le plasmide est transformé dans la souche d'expression *E. coli* BL21(DE3). Les enzymes ont été clonées

sans leur peptide signal (déterminé par iPSORT, [Bannai, 2010]) avec un tag-histidine en N-terminal.

Tableau 4.1 – Amorces utilisées lors du chapitre 4.

Désignation	Séquence des amorces 5' → 3'	Enzyme clonée
05851 f	ac CGTCTC ccatgtcgcccaccactcctc	FG05851
05851 R	ac CGTCTC gaatttagttgacagacagactg	
07892 f	atcg GGTCTC ccatgcagcgtgaagcaacagg	FG07892
07892 R	atcg GGTCTC gaatttcaagccttctttccaacg	
11037 f	atcg GGTCTC ccatgcagtctctctcgacca	FG11037
11037 R	atcg GGTCTC ccatgaggttgatgcactcatagg	
03029 f	tctaa CCATGG ctcaaaccgatcagaagggaac	FG03029
03029 R	atcg GGTCTC gaatttcatgacagaacagcactgattac	

4.2.4.2 Culture et purification des GH12

Les cultures sont placées à 37 °C sous agitation à 220 rpm puis induites à 16 °C à 0,25 mM d'IPTG à une $DO_{600\text{ nm}}$ comprise entre 0,8 et 1. Après induction pendant 16 h, les culots de culture sont récupérés puis lysés selon le protocole expliqué en chapitre 3 (Section 3.2.4, page 72). Les protéines recombinantes sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de type HisTrap (GE Healthcare) selon la méthode décrite en section 3.2.6 (page 73).

4.2.4.3 Caractérisation des GH12 et spécificité de substrat

Après détermination des conditions optimales en température et en pH (gamme testée en pH 4 et pH 7, avec des températures allant de 30 °C à 80 °C), des tests de spécificité de substrat ont été effectués. Les substrats utilisés sont des substrats solubles fournis par Megazyme ou Sigma, à une concentration finale de 0,5 %.

4.2.5 Immunodétection

Lors de ce chapitre, les anticorps polyclonaux ont été utilisés selon le protocole décrit dans la section 3.2.8 (page 75) du chapitre 2.

La production d'anticorps monoclonaux spécifiques des inhibiteurs a été entreprise. Des cultures de 500 ml de LB sont réalisées pour chaque inhibiteur de houblon (construction en BL21(DE3) dans le vecteur pET-30a, section 3.2.2.2, page 65) et produites à une température de 37 °C (incluant l'induction à 0,25 mM d'IPTG), favorisant ainsi la formation de corps d'inclusion. Les culots sont lavés, solubilisés puis purifiés selon les protocoles décrits dans les

sections 3.2.5 et 3.2.6 (pages 72 et 73). 1 000 μg de corps d'inclusion de chaque inhibiteur sont dialysés contre du PBS 1X. Les protéines précipitées sont injectées dans deux souris par la plateforme des anticorps monoclonaux de l'IGBMC (Illkirch, France). Un premier criblage est effectué par western blots sur les hybridomes à partir d'échantillons issus de cultures induites en *E. coli* afin de déterminer les colonies positives et d'éventuelles spécificités à l'inhibiteur n° 1, l'inhibiteur n° 2 ou l'inhibiteur n° 3. L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-souris (Anti-Mouse IgG, Sigma), couplé à la peroxidase. Après clonage des hybridomes sélectionnés, de nouveaux western blots sont effectués dans le but de confirmer les premières sélections. La production des anticorps monoclonaux s'effectue sous forme d'ascites.

4.2.6 Outils statistiques

Les tests statistiques et les graphiques ont été effectués à l'aide du logiciel R [Ihaka and Gentleman, 1996].

4.2.7 Bioinformatique

Utilisant les séquences d'acides aminés des inhibiteurs, nous avons recherché l'existence de protéines similaires dans les bases de données du PDB (Protein Data Bank). Une protéine (PDB n° 3HD8) montre 31,48 %, 31,49 % et 29,85 % d'identité respectivement pour les inhibiteurs n° 1, n° 2 et n° 3. Cette protéine correspondant à un inhibiteur de type TAXI (TAXI-II, [Pollet et al., 2009b]) a ainsi été utilisée pour l'élaboration des structures tridimensionnelles prédites via le programme Swiss model server [Arnold et al., 2006]. Selon le même principe, les structures tridimensionnelles prédites des GH12 de *F. graminearum* ont été élaborées. Les données relatives à ces structures sont présentées dans le tableau 4.2 (page 103).

Tableau 4.2 – Données relatives à l'élaboration des structures tridimensionnelles prédites des GH12 de *F. graminearum*.

Numéro d'accèsion	Pourcentage d'identité	Protéine de référence
FG03029	21,05 %	1OA2 : endoglucanases de <i>Trichoderma reesei</i> (GH12) [Sandgren et al., 2003b]
FG05851	38,22 %	
FG07892	38,22 %	
FG11037	55,45 %	1OLR : endoglucanases de <i>Humicola grisea</i> (GH12) [Sandgren et al., 2003a]

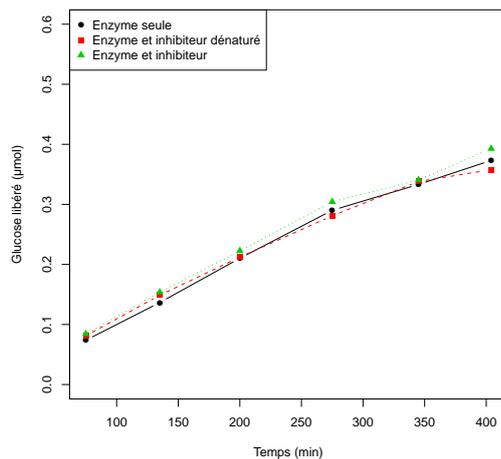
Les figures des structures tridimensionnelles prédites ont été générées en utilisant le logiciel PyMol [Schrödinger, 2010].

4.3 Résultats

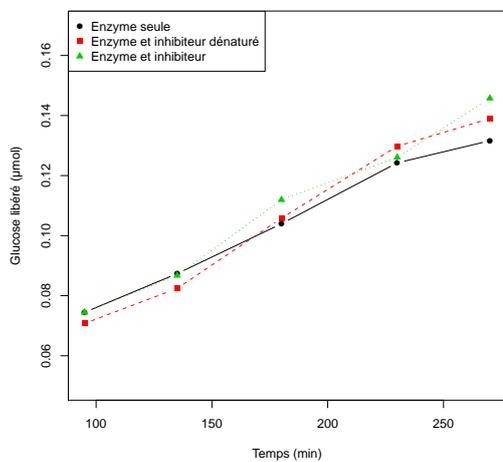
Les tests d'inhibition ont été réalisés avec l'ensemble des inhibiteurs exprimés en cellules d'insectes ou dans *E. coli* : les surnageants de lyse (les protéines extracellulaires), les protéines sécrétées, les éluats issus de purifications ou encore les protéines sous forme de corps d'inclusion. La littérature scientifique indique qu'une inhibition est effective pour un ratio XEGIP : GH12 équimolaire [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005]. Le ratio est également de 1 : 1 dans le cas des inhibiteurs de type XIP ou TAXI [Gebruers et al., 2001, Tahir et al., 2002, Fierens et al., 2005]. Afin de maximiser les chances d'observer une inhibition, les interactions inhibiteurs / enzymes ont été testées en privilégiant un excès d'inhibiteurs par rapport à la quantité d'enzymes. Néanmoins, les difficultés à quantifier les XEGs ou les inhibiteurs présent en surnageant n'a pas permis de définir avec exactitude ce ratio dans de nombreux cas. Les références bibliographiques montrent que les XEGIPs ont la capacité d'inhiber les enzymes de la famille des GH12 et notamment celles d'*A. aculeatus* présentes dans le cocktail enzymatique commercial, le Viscozyme.

4.3.1 Résultats des tests d'inhibition à partir des inhibiteurs produits dans *E. coli* et dans le vecteur pAcSG en cellules d'insectes

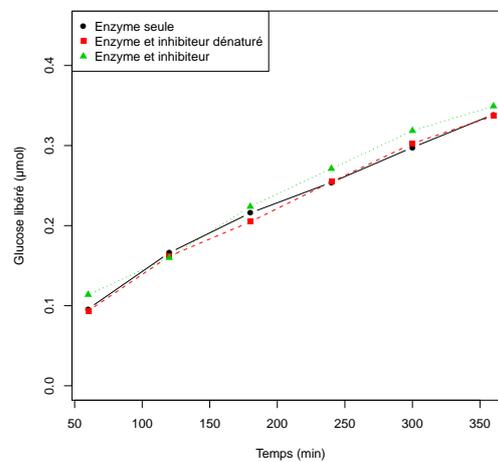
Les inhibiteurs exprimés dans *E. coli*, ainsi que les constructions en cellules d'insectes dans le vecteur pAcSG, n'ont pas permis de visualiser une inhibition lors des tests enzymatiques sur un substrat xyloglucane, et ce quelque soit les enzymes utilisées. La figure 4.1 (page 105) montre un aperçu des résultats obtenus.



(a) 1,20 nmol de corps d'inclusion de l'inhibiteur n° 1 en BL21(DE3) et 4,55 µg de Viscozyme.



(b) 0,4 nmol d'éluat de purification de l'inhibiteur n° 1 dans Arctic et 2,28 µg de Viscozyme.



(c) 118 µg de surnageant de lyse de 4.10^5 cellules de l'inhibiteur n° 1 en cellules d'insectes dans le vecteur pAcSG et 4,55 µg de Viscozyme.

Figure 4.1 – Exemple de tests d'inhibition négatifs mettant en interaction des protéines recombinantes d'*E. coli* ou de cellules d'insectes dans le vecteur pAcSG avec plusieurs enzymes sur xyloglucane.

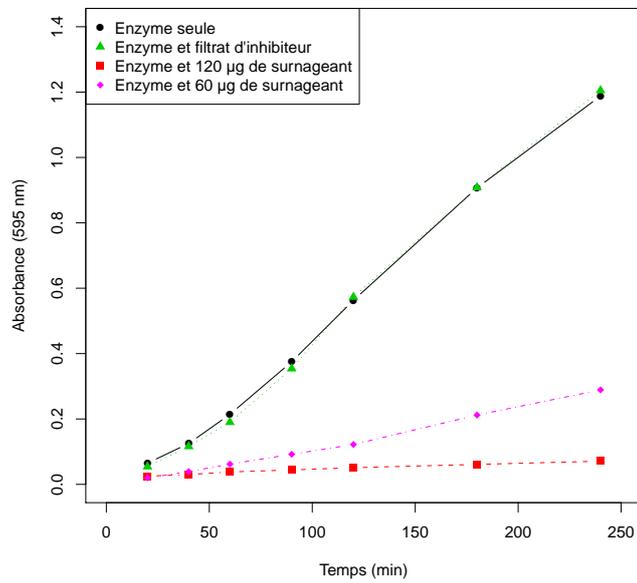
4.3.2 Résultats des tests d'inhibition à partir des inhibiteurs dans le vecteur pAcGP67B en cellules d'insectes

4.3.2.1 Tests préliminaires sur le Viscozyme

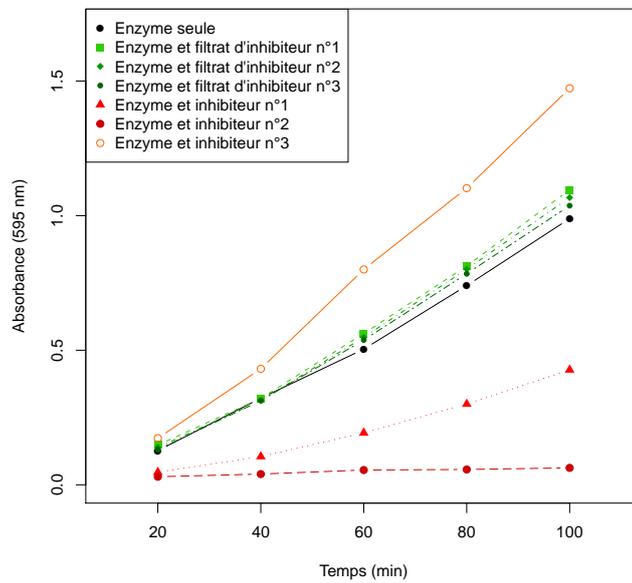
Les premiers essais d'inhibition ont été entrepris sur le Viscozyme avec les protéines recombinantes issues des cultures avant l'optimisation consistant en une baisse de la titration en virus (Section 3.3.4.2, page 92). Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.2 (page 107). Les enzymes de Viscozyme ont dans un premier temps été mises en contact avec un mélange des trois inhibiteurs provenant des surnageants de culture (Figure 4.2a, page 107). 120 μg de protéines permettent alors une inhibition de l'ordre de 95 % de l'activité enzymatique du Viscozyme. C'est la première fois chez les XEGIPs que l'utilisation d'inhibiteurs recombinants permet de réduire nettement une activité enzymatique. L'interaction avec une quantité inférieure en protéines sécrétées (60 μg) maintient une forte inhibition à un taux de 75 %. Les tracés cinétiques du contrôle enzyme (tracé noir) et du contrôle tampon (tracé vert) sont confondus. Ces premiers essais mettent en évidence la présence de protéines responsables d'une inhibition des enzymes avec notamment un effet dose dépendant.

Un second essai a été entrepris en travaillant séparément avec les inhibiteurs et non en mélange. La figure 4.2b (page 107) présente les tests d'inhibition effectués avec chaque inhibiteur. On constate une forte inhibition de 95 % pour l'inhibiteur n° 2 et une inhibition nette d'environ 55 % pour l'inhibiteur n° 1. L'inhibiteur n° 3 ne semble pas avoir de capacité inhibitrice mais présente un effet activateur non expliqué à l'heure actuelle.

Les divergences existant entre les trois inhibiteurs en terme de capacité inhibitrice permettent d'écarter la possibilité que l'effet d'inhibition soit dû à la présence de la protéine à la taille de 70 kDa (Figure 3.18a, page 93), protéine en concentration identique quelque soit l'inhibiteur. Elle n'est pas non plus liée à une petite molécule comme suggéré par les profils des témoins « filtrat ».



(a) Interaction entre 4,55 µg de Viscozyme et deux quantités différentes d'un mélange de surnageant de culture des trois inhibiteurs en cellules d'insectes, montrant une inhibition partielle ou complète de l'activité enzymatique.



(b) Interaction entre 4,55 µg de Viscozyme et 100 µg de surnageant de culture des trois inhibiteurs en cellules d'insectes, montrant une inhibition différentielle de l'activité enzymatique selon l'inhibiteur.

Figure 4.2 – Action inhibitrice de surnageants de culture en cellules d'insectes dans le vecteur pAcGP67B mis en contact avec le Viscozyme sur un substrat AZCL-xyloglucane.

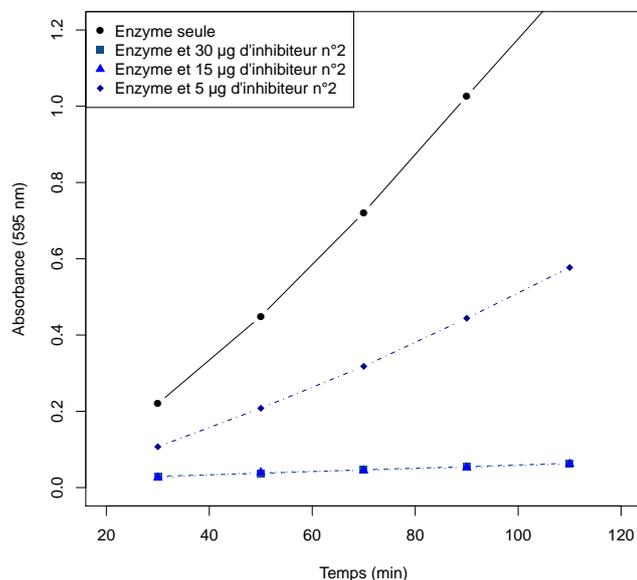
4.3.2.2 Confirmation des essais d'inhibition après optimisation des cultures en pAcGP67B et travaux sur les surnageants de culture de *F. graminearum*

L'optimisation des cultures en pAcGP67B a permis de réduire la quantité en protéines contaminantes et de ce fait d'augmenter la proportion des inhibiteurs dans les surnageants de culture. Dans un premier temps, des tests d'inhibition avec le Viscozyme ont été entrepris afin de confirmer les données précédentes. En second temps, les inhibiteurs ont été mis en interaction avec des surnageants de culture de *F. graminearum* sur différents substrats (Section 4.3.2.3, page 111). Nous verrons que les résultats obtenus nous ont amenés à nous intéresser plus spécifiquement aux GH12 de *F. graminearum*.

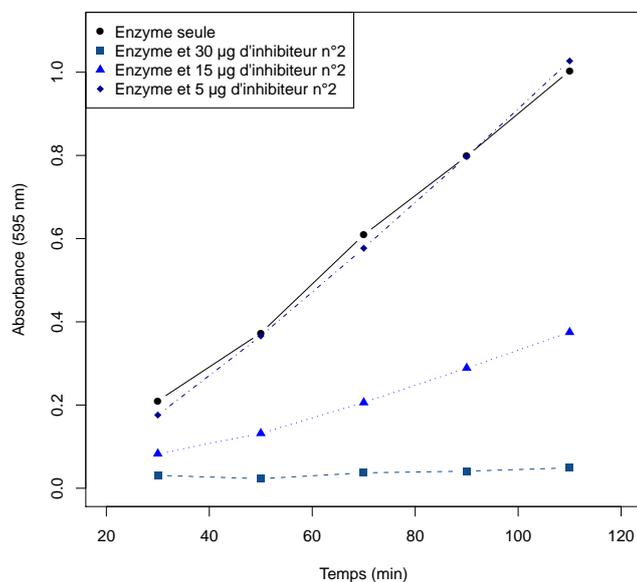
Dans le but de déterminer le temps optimal pour la récupération des cultures en cellules d'insectes, les temps 72 h et 96 h de l'inhibiteur n° 2 ont été analysés en faisant varier la quantité des protéines du surnageant de culture. Les figures 4.3a et 4.3b présentent les résultats obtenus lors de ces tests enzymatiques. 15 μg de protéines du surnageant de culture au temps 72 h permettent une inhibition de l'ordre de 95 %, tandis qu'elle n'est que de 65 % au temps 96 h. Pour 5 μg de protéines de surnageant, on constate une absence d'inhibition au temps 96 h, et une inhibition de 55 % au temps 72 h. Au temps 96 h, le début de lyse cellulaire, observée par microscopie (Figure 3.19c, page 93), entraîne dans le surnageant de culture une augmentation de la concentration en protéines endogènes, pouvant ainsi diminuer la proportion de nos protéines d'intérêt. Les expérimentations suivantes ont ainsi été effectuées à partir des surnageants de culture au temps 72 h. La figure 4.4a (page 110) présente les résultats d'interaction avec 30 μg d'inhibiteur n° 2 et le Viscozyme, issus de trois réplicats, validant ainsi le modèle. 97 % de l'activité enzymatique est inhibé par l'inhibiteur n° 2. Les tests d'inhibition avec l'inhibiteur n° 1 et l'inhibiteur n° 3 (Figure 4.4b, page 110) sont très cohérents avec ceux obtenus avant optimisation ; une inhibition de l'ordre de 80 % pour l'inhibiteur n° 1 et une absence d'inhibition pour l'inhibiteur n° 3.

Il a été montré que les inhibiteurs de type TLXI ou XIP ont une activité inhibitrice dépendante de la température et du pH, avec par exemple un maximum d'inhibition atteint à 40 °C et pH 5 pour les protéines TLXI [Flatman et al., 2002, Fierens et al., 2009]. Dès lors, il a été supposé que l'incapacité à inhiber de l'inhibiteur n° 3 puisse être due à des conditions d'inhibition différentes de celles de l'inhibiteur n° 1 et de l'inhibiteur n° 2. L'activité de l'inhibiteur n° 3 a ainsi été testée aux températures de 30 °C et 40 °C, et à pH 6 et à pH 4. Ces conditions n'ont pas permis d'observer une activité inhibitrice de l'inhibiteur n° 3, contrairement à l'inhibiteur n° 2 dont l'activité a été maintenue à l'identique (*données non montrées*). Les différences observées entre les trois inhibiteurs seront explicitées dans la partie discussion de ce chapitre. L'inhibiteur n° 2 montrant une activité supérieure aux deux autres pour une même quantité protéique, les expérimentations suivantes se sont concentrées sur cet inhibiteur.

L'absence d'inhibition lors des interactions entre les protéines du surnageant de culture de la souche sauvage de baculovirus et les enzymes du Viscozyme (*données non montrées*) permet de confirmer que l'action inhibitrice est due aux protéines recombinantes et non aux protéines endogènes. En outre, l'absence significative d'inhibition (*données non montrées*) au temps 24 h conforte également le fait que les phénomènes d'inhibition sont dus aux protéines recombinantes, c'est-à-dire aux inhibiteurs de houblon.

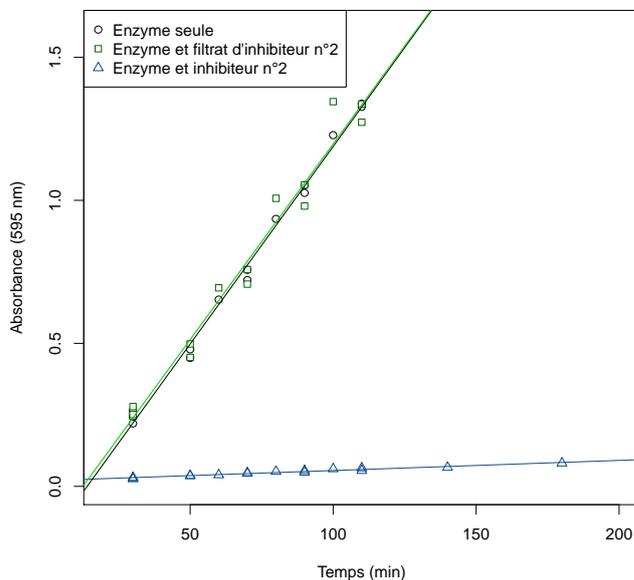


(a) Interaction entre 4,55 µg de Viscozyme et différentes quantités de l'inhibiteur n° 2 produits en cellules d'insectes au temps 72 h montrant une inhibition partielle ou complète de l'activité enzymatique. Les tracés *Enzyme et 30 µg d'inhibiteur* et *Enzyme et 15 µg d'inhibiteur* sont confondus.

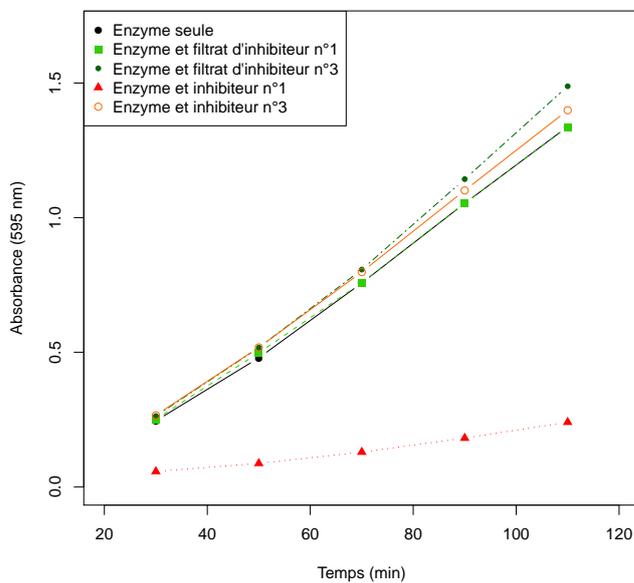


(b) Interaction entre 4,55 µg de Viscozyme et différentes quantités de l'inhibiteur n° 2 produits en cellules d'insectes au temps 96 h montrant une inhibition partielle ou complète de l'activité enzymatique.

Figure 4.3 – Action inhibitrice du surnageant de l'inhibiteur n° 2 de culture en cellules d'insectes, après optimisation, au temps 72 h et 96 h, avec le Viscozyme sur un substrat AZCL-xyloglucane.



(a) Interaction entre 4,55 μg de Viscozyme et 30 μg de l'inhibiteur n° 2. Les droites représentent les régressions linéaires de trois réplicats biologiques, soit 21 valeurs par condition. Les modèles de régressions linéaires ont été validés par l'utilisation d'un test de Fisher.



(b) Interaction entre 4,55 μg de Viscozyme et 60 μg de l'inhibiteur n° 1 ou de l'inhibiteur n° 3 en cellules d'insectes au temps 72 h montrant une inhibition partielle ou complète de l'activité enzymatique.

Figure 4.4 – Action inhibitrice de surnageants de culture en cellules d'insectes, après optimisation, mis en contact avec le Viscozyme sur un substrat AZCL-xyloglucane.

4.3.2.3 Tests d'inhibition sur les surnageants de culture de *F. graminearum*

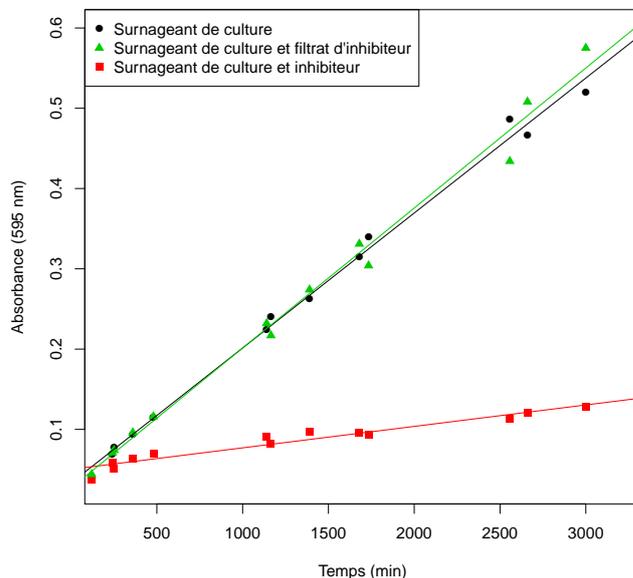
Comme décrit précédemment, les inhibiteurs recombinants ont été mis en contact avec des surnageants de culture de *F. graminearum* ayant poussé sur milieu minimum auquel est ajouté une des sources de carbone suivantes : parois de houblon, son de blé, rafles de maïs ou glucose. À l'exception du surnageant de culture sur glucose, présentant une faible concentration en protéines, un volume identique de surnageant (3,5 μ l) a été mis en contact avec 60 μ g de l'inhibiteur n° 2. Les résultats des tests enzymatiques sur un substrat AZCL-xyloglucane, avec notamment des réplicats biologiques, sont présentés en figures 4.5 et 4.6 (pages 112 et 113).

Ces graphiques montrent une inhibition de l'activité enzymatique des quatre surnageants de culture testés (*F. graminearum* sur parois de houblon, son, rafles de maïs et glucose) lorsque ces enzymes sont en présence de l'inhibiteur n° 2 recombinant. Les activités enzymatiques des surnageants de *F. graminearum* sont inhibées respectivement à 75 % et à 40 % par l'inhibiteur n° 2 lorsque le champignon a poussé sur son ou sur rafles de maïs (Figures 4.5a et 4.5b, page 112). Les surnageants de culture sont inhibées à 55 % et 50 % dans le cas d'une croissance sur un milieu à base de parois de houblon ou de glucose (Figures 4.6a et 4.6b, page 113). Ces résultats suggèrent l'existence d'enzyme(s) inhibé(s) par les protéines de houblon. On peut noter que l'utilisation de l'inhibiteur n° 1 sur ces enzymes conduit également à une diminution de l'activité xyloglucanase, contrairement à l'inhibiteur n° 3 qui ne montre pas de propriété inhibitrice vis-à-vis de ces enzymes.

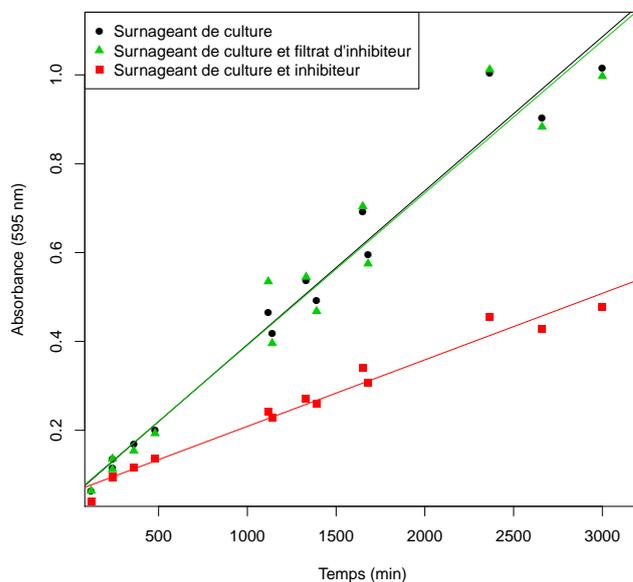
L'analyse par spectrométrie de masse (données faisant l'objet d'une publication dans le cadre d'un projet annexe qui ne seront pas explicitées dans ce manuscrit) a permis de révéler dans les surnageants de parois de houblon, de son et de rafles de maïs la présence d'une enzyme répertoriée dans la famille des GH12, d'après les bases de données du génome de *F. graminearum*. Il s'agit de la protéine connue sous le numéro d'accèsion FG11037. L'ensemble des données du laboratoire permettent d'affirmer que cette enzyme est responsable de l'activité xyloglucanase observée dans ces surnageants de culture de *F. graminearum* [Phalip et al., non publiée].

L'activité xyloglucanase des enzymes issues de culture de *F. graminearum* sur glucose est faible et ce malgré le volume important utilisé (100 μ l) dans le cadre des tests enzymatiques. Dans ce substrat, aucune GH12 n'est mise en évidence en spectrométrie de masse. Néanmoins, il est important de souligner que ces analyses ont été réalisées à partir d'un équivalent de 800 μ l de surnageant. Une étude en protéomique [Phalip et al., 2005] a montré la présence d'une GH12, de numéro d'accèsion FG05851, dans des surnageants de culture de *F. graminearum* ayant poussé sur glucose. Ces analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées avec un équivalent de 6,5 ml de surnageants de culture à mettre en relation avec les 800 μ l évoqués précédemment. On peut ainsi émettre l'hypothèse que ce volume analysé en MALDI-TOF lors de cette nouvelle étude n'était pas suffisant pour la détection des GH12. Par ailleurs, il est également possible que d'autres enzymes, n'appartenant pas à la famille des GH12, soient à l'origine de l'activité xyloglucanase observée. C'est notamment le cas des enzymes de la famille des GH5, GH16, GH44 ou GH74 ayant une activité xyloglucanase de type EC 3.2.1.151 et pouvant ainsi hydrolyser le substrat AZCL-xyloglucane.

Ces deux enzymes, FG11037 et FG05851, à l'origine des activités xyloglucanase observées sur le substrat AZCL-xyloglucane pourraient être inhibées par les XEGIPs de houblon. C'est dans ce cadre que le clonage de plusieurs GH12 de *F. graminearum* a été réalisé.

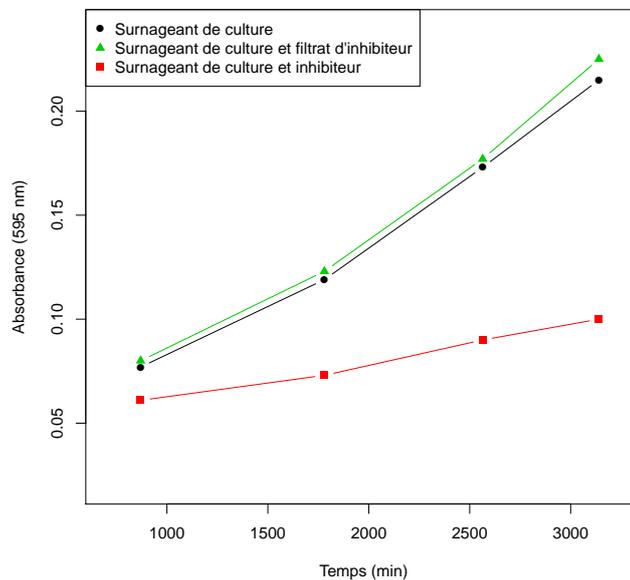


(a) Interaction entre $3,5 \mu\text{l}$ de surnageant d'une culture de *F. graminearum* sur son de blé et $60 \mu\text{g}$ de surnageant de culture de l'inhibiteur n° 2 produit en cellules d'insectes. Les droites représentent les régressions linéaires de deux réplicats biologiques.

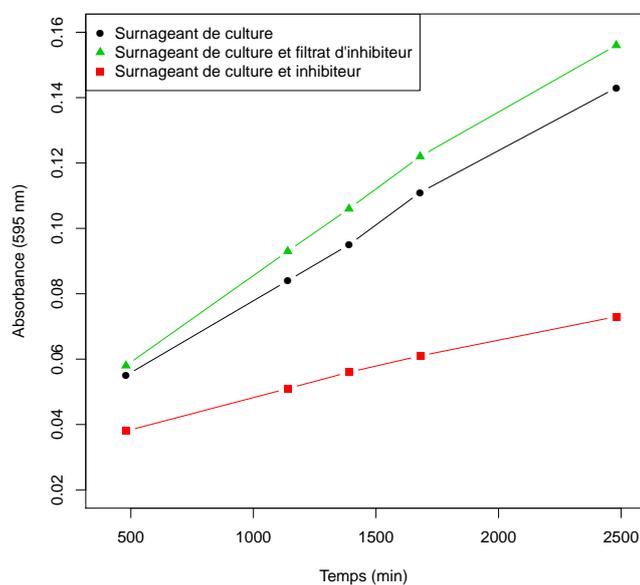


(b) Interaction entre $3,5 \mu\text{l}$ de surnageant d'une culture de *F. graminearum* sur rafles de maïs et $60 \mu\text{g}$ de surnageant de culture de l'inhibiteur n° 2 produit en cellules d'insectes.

Figure 4.5 – Action inhibitrice du surnageant de culture au temps 72 h de l'inhibiteur n° 2 en cellules d'insectes mis en contact avec des surnageants de culture de *F. graminearum* ayant poussé sur son de blé ou rafles de maïs. Les tests enzymatiques sont effectués sur AZCL-xyloglucane. Les droites représentent les régressions linéaires de deux réplicats biologiques. Les modèles de régression linéaires ont été validés par l'utilisation d'un test de Fisher.



(a) Interaction entre $3,5 \mu\text{l}$ de surnageant d'une culture de *F. graminearum* sur parois de houblon et $60 \mu\text{g}$ de surnageant de culture de l'inhibiteur n° 2 produit en cellules d'insectes.



(b) Interaction entre $100 \mu\text{l}$ de surnageant d'une culture de *F. graminearum* sur glucose et $60 \mu\text{g}$ de surnageant de culture de l'inhibiteur n° 2 produit en cellules d'insectes

Figure 4.6 – Action inhibitrice du surnageant de culture au temps 72 h de l'inhibiteur n° 2 produit en cellules d'insectes mis en contact avec des surnageants de culture de *F. graminearum* ayant poussé sur parois de houblon ou glucose. Les tests enzymatiques sont effectués sur AZCL-xyloglucane.

4.3.3 Etude et caractérisations de GH12 de *F. graminearum*

Comme décrit dans la section précédente, deux enzymes de la famille des GH12 de *F. graminearum* ont été identifiées comme cible potentielle des XEGIPs de houblon. Pour l'heure, la famille des GH12 n'est que peu étudiée chez le genre *Fusarium* et aucune étude complète n'a été réalisée. Seule une endoglucanase de *F. equiseti* (numéro d'accension : Q8NJZ4) a été décrite dans la littérature lors d'une étude sur la découverte de 15 nouvelles GH12 d'origine fongique [Goedegebuur et al., 2002]. Les travaux suivants ont été entrepris dans le but de valider l'inhibition de ces protéines par les XEGIPs du houblon et caractériser ces enzymes cibles. Ce projet a permis de mettre en lumière certaines de leurs caractéristiques. Il existe de nombreux exemples d'enzymes appartenant à la famille des GH12 qui sont utilisées dans des processus industriels. Les intérêts vont grandissant dans l'application de ces enzymes dans l'industrie agroalimentaire, les processus de textiles ou encore les applications pharmaceutiques [Goedegebuur et al., 2002, Master et al., 2008]. L'étude de ces enzymes a donc un potentiel industriel important.

4.3.3.1 Clonage des quatre GH12 de *F. graminearum*

D'après les bases de données du génome de *F. graminearum* [Wong et al., 2011], cinq séquences protéiques montrent des similitudes avec des GH12. Seules quatre d'entre elles ont été retenues et clonées : FG03029, FG05851, FG07892 et FG11037. La cinquième protéine présente des similitudes faibles et très localisées et n'a ainsi pas été sélectionnée. Les différentes sources en carbone utilisées pour la croissance des champignons ont permis de montrer, après extraction d'ARN et synthèse d'ADNc, une expression différentielle de ces enzymes selon le substrat utilisé. Les analyses en spectrométrie de masse discutées précédemment confirment d'ailleurs que selon les substrats utilisés l'expression des CWDEs diffèrent. La figure 4.7 (page 115) présente les RT-PCRs effectuées à partir d'extractions d'ARN et de synthèses d'ADNc de *F. graminearum* ayant poussé sur CMC ou sur bouleau. L'enzyme FG07892 est exprimée sur l'ensemble des substrats utilisés tel que la CMC, contrairement à FG05851 et FG11037 (Figure 4.7a). Cette dernière est d'ailleurs exprimée uniquement sur bouleau (Figure 4.7b) et non sur les autres sources carbonées (xylane, parois de houblon ou son). L'expression de FG03029 a été testée uniquement sur parois de houblon et bouleau et est exprimée sur ces deux sources carbonées.

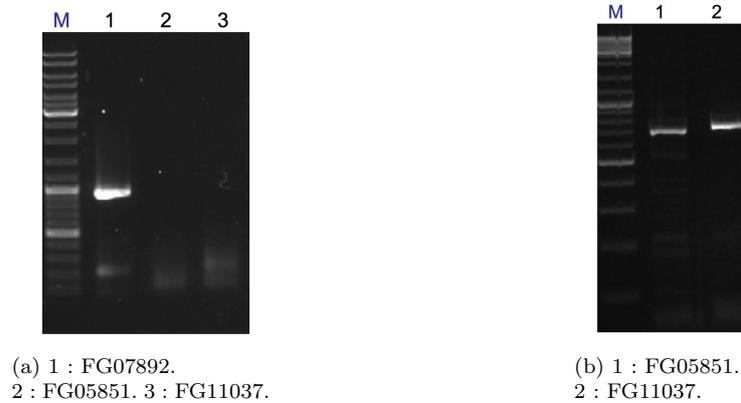


Figure 4.7 – RT-PCR effectuée à partir d'ADNc de *F. graminearum* cultivé sur CMC (a) et sur bouleau (b). M : GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas.

Ces protéines ont été séquencées et leurs séquences présentées à la figure 4.9 (page 116) montrant notamment la position du peptide signal. Les séquences ont été comparées avec l'ADNg de *F. graminearum*, mettant en évidence la présence d'introns.

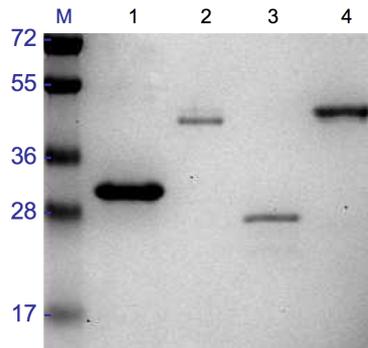


Figure 4.8 – SDS-PAGE représentant les éluats de purification des GH12 de *F. graminearum*. M : marqueur de taille. 1 : FG03029. 2 : FG05851. 3 : FG07892. 4 : FG11037.

Les protéines, clonées dans le vecteur pET-30a, ont été purifiées sur colonne His-Trap avec une pureté supérieure à 90 %. La figure 4.8 (page 115) présente les éluats de purification de chacune de ces enzymes.

<i>FG03029</i>	
<i>mrlialigsaltvlpdlvs</i> gQTDQKGTVCGNQRFGNLNDSLSYYPNAWNK	50
KSPKSGFVCLKVDNSTPAFDATWNWDKNIQDVHSFPYVRFNHPDLP IRLK	100
DLESIRLSTDWIYTPGNPSQPPQDFSSSKWAENKAQLNSKGMQANAADF	150
FLDDDRNRTLYPQVAAVEIMVWLGSGVDPWWLGRANNSIISTVTLGKTDF	200
SLFYGRNSGGTHVFTAVTKDNTDILSFDEFYPLFKFVLQQAYKHIDEPN	250
DLPKDPWLGIIEFGTETWLSNGNATFTAANFAMD LKSNVTDNDHNSTGSG	300
NGGNKTSDDGRDKGDDASKGNEGDKSGNDNGDNSTSKGDEEDNARRLMN	350
NSVLGYVVTAAALVISAVLS	369
<i>FG05851</i>	
<i>mkflsivslaaavaa</i> SPTTPSKTLDKRATTWCDAFGSLQTAGYTVYHNN	50
WGRGEATSGQQCTTFNSYNSGFSFSWSTKWTWAGGNIHVKSYSNVALEKIN	100
KKVSAIKSIPTKWNWRYTGSNMVADVSYDLWLAPSVGANNKYEIMIWLGS	150
YGGAGPISDHGSTPIATLTINGSQWKLFRGPNGD TTVYSFVSTKNLGNFQ	200
GDLLPFLTYLTKSQGVPSYVATSFQAGTEPFVGSNCVFTTSAYSLSVN	249
<i>FG07892</i>	
<i>mtirflvnfgllalpiaitlgvliglqs</i> QREATGGPPLFKPDPKPTGPKK	50
KTGITTEQHCKQSYGIHPETKQGEYTLNPNQGWDEGDDGGLCLYVNMNN	100
NETYATNHTAPRWSVVWEYPQGPETAPVHAFPNIKVDGDVFP AKLSSIDK	150
IEIDFEWTYAVGNKSAKGAKQVTKDLDLKDHLNANVAMDMFMSDKT	200
KAQDSEASHEIMVWF AAIGPATQPLGFNV DGSNPLAKKTLDGTEFKLYY	250
DINQAKQKVL TWYADTPAEKFDGDLWPLIDEILSMDNADYPSASDYIGYM	300
SWGTEAYSVNTTVTFDVP SLSINVGKKA	328
<i>FG11037</i>	
<i>mkasvgflaaflaputla</i> QSLCDQYSYYANGGYEFNNNRWGQSGSGSQC	50
TYIDWTNSNGAGWHTDWTWSGGQDNVKAYPNSGLQISNKRLSSISNMQS	100
AAAWSYSGTNVRANVAYDLFTASDPNHVTYSGDYELMIWLG RYGGVQPIG	150
SKVGNANVEGRTWELWSGMNGSMRVYSFVAPNPVTNFNSDVKQFWNYLAN	200
TQGYPA SKQYLLTFQFGTEPFTGSGAQFKVTNFNAHIN	238

Figure 4.9 – Séquences protéiques complètes des quatre GH12 de *F. graminearum*. La séquence signal des protéines est représentée par les acides aminés en minuscule.

4.3.3.2 Caractérisation des quatre GH12 de *F. graminearum*

L'ensemble des travaux effectués sur ces quatre GH12 fait l'objet d'une publication [Habylo et al., en préparation]. Les résultats mis en exergue dans ce paragraphe renvoient essentiellement aux caractéristiques concernant la spécificité de ces enzymes et leur mode d'action. Les enzymes clonées ont montré une capacité d'hydrolyse validant l'activité de ces enzymes. Le tableau 4.3 (page 117) présente les résultats obtenus sur différents substrats à pH 6 et une température de 50 °C, en fonction de l'activité relative sur xyloglucane. Sur ce substrat xyloglucane, les enzymes FG11037 et FG05851 ont montré une très forte activité. Des tests enzymatiques sur AZCL-xyloglucane valident l'activité de ces enzymes et ce substrat pourra ainsi être utilisé dans le cadre des tests d'inhibition. L'enzyme FG11037 présente une capacité d'hydrolyse sur de nombreux substrats testés, avec une activité importante sur le substrat β -D-glucane d'orge et lichénane. Ces résultats laissent supposer un mécanisme enzymatique différent.

Tableau 4.3 – Spécificité de substrats des quatre GH12 de *F. graminearum*.

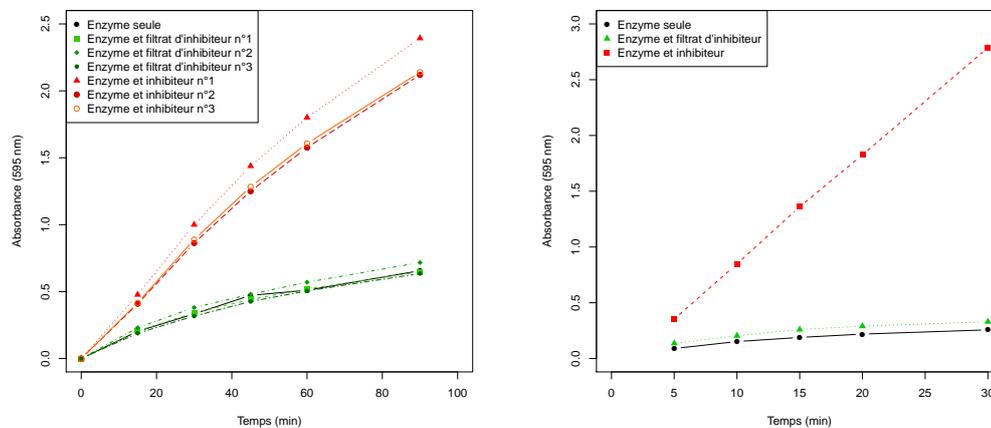
Substrat soluble	Activité spécifique relative (% d'activité sur xyloglucane)			
	FG03029	FG05851	FG07892	FG11037
Xyloglucane de tamarin	100	100	100	100
β -D-glucane d'orge	1 550	1,0	402	220
Xylane d'avoine	100	0,8	100	1,6
CMC	50	0,0	100	41
Lichénane de <i>Cetraria islandica</i>	1 600	1,5	402	282

L'influence de la concentration en substrat a été testée et a permis la détermination des constantes cinétiques (K_M et k_{cat}) ainsi que la caractérisation des mécanismes michaeliens pour les enzymes FG03029, FG07892 et FG05851. Les cinétiques enzymatiques de FG11037 sur le substrat xyloglucane (trois répétitions) ont montré que cette enzyme ne répondait pas au modèle michaelien mais à celui d'un mécanisme allostérique. Ce type de mécanisme est pour l'heure inconnu chez les enzymes de la famille des GH12 et à notre connaissance, seule une étude sur une endo- β -1,4-xylanase appartenant à la famille des GH11 relate de ce type de mécanisme chez les glycosydes hydrolases [Boukari et al., 2011]. C'est la première fois qu'un tel comportement est mis en évidence. Les effecteurs possibles sont actuellement en étude. Des analyses en PACE (*polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis*) ont montré, par l'obtention d'oligomères différents, des mécanismes enzymatiques différents. Ces analyses sur les GH12 de *F. graminearum* et les différences de mécanismes observées pourraient impliquer une action adaptée des inhibiteurs.

4.3.3.3 Interaction entre les inhibiteurs et les enzymes de *F. graminearum*

Les quatre GH12 clonées et purifiées ont été testées en présence des inhibiteurs recombinants produits dans le système baculovirus. La figure 4.10a (page 119) présente les résultats obtenus pour FG11037. On constate que la présence des inhibiteurs produits en cellules d'insectes ne diminue pas l'activité de l'enzyme, mais au contraire l'augmente. Ce constat est similaire pour les trois autres enzymes clonées.

Par ailleurs, les inhibiteurs ont été testés en présence de GH10 (XP_391480) et GH11 (XM_383800) de *F. graminearum*. La littérature décrit les XEGIPs comme étant incapables d'inhiber les enzymes autre que celles de la famille des GH12 [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005]. Ainsi les GH10 et GH11 connues pour être inhibées par les inhibiteurs de xylanases (TAXI, XIP, TLXI) ne le sont effectivement pas en présence de XEGIPs. La figure 4.10b (page 119) présente les résultats obtenus pour la GH11 en présence d'un mélange d'inhibiteurs. Selon le même phénomène que lors des interactions GH12 / inhibiteur, la GH11, mais également la GH10 (*données non montrées*), voit son activité augmenter en présence des inhibiteurs.



(a) Interaction entre 0,05 nmol de GH12, FG11037 et 100 ng de surnageants de culture des trois inhibiteurs produits en cellules d'insectes, sur substrat AZCL-xyloglucane.

(b) Interaction entre 0,005 nmol de GH11, XM_383800 et 110 ng d'un mélange de surnageants de culture des trois inhibiteurs produits en cellules d'insectes, sur substrat AZCL-xylane.

Figure 4.10 – Interaction des inhibiteurs recombinants produits dans le système en cellules d'insectes et deux enzymes recombinantes : FG11037 (GH12) et XM_383800 (GH11) de *F. graminearum*.

Ces deux résultats ne permettent pas de conclure quant à la capacité des XEGIPs de houblon à inhiber ou non ces enzymes produites de façon hétérologue par un système *E. coli*. Pour l'heure, ces résultats restent inexplicables, et ce malgré les travaux effectués pour comprendre ce phénomène (changement de tampon, ajout de NaCl pour augmenter la force ionique, ...).

4.4 Discussion

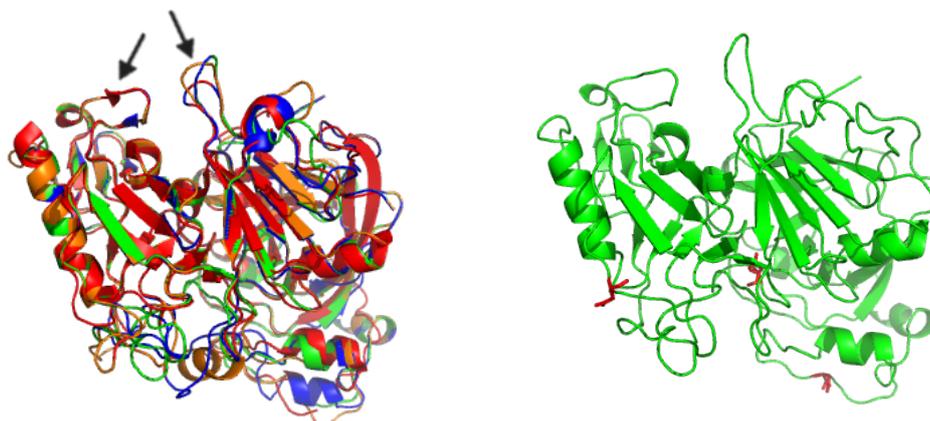
Suite à la production des inhibiteurs du houblon, les tests enzymatiques d'inhibition ont été entrepris. Les inhibiteurs recombinants produits dans *E. coli* n'ont pas permis de mettre en évidence la capacité inhibitrice de nos protéines d'intérêt et les causes éventuelles seront discutées ci-dessous. Seules les protéines sécrétées dans le système « baculovirus » ont permis de valider cette fonction. À l'heure actuelle, seules des enzymes d'*A. aculeatus* et celles provenant de surnageants de culture de *F. graminearum* (ayant poussé sur paroi de houblon, son, rafles de maïs ou glucose) ont pu être inhibées. Les GH12 de *F. graminearum* clonées dans *E. coli* n'ont en effet pu être inhibées et plusieurs hypothèses seront envisagées pour expliquer ce phénomène. Une discussion sur ces GH12 de *F. graminearum* sera également menée. Enfin, il sera question du rôle des inhibiteurs vis-à-vis des interactions avec ces CWDEs et leur rôle potentiel dans la défense de la plante.

4.4.1 Protéines recombinantes produites dans *E. coli* et absence de capacité inhibitrice

La première hypothèse pouvant expliquer l'absence d'inhibition avec les XEGIPs clonées dans *E. coli* est la production de protéines recombinantes solubles mais sous une forme non active, notamment du fait de la nécessité des glycosylations et de la formation de ponts disulfures. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3 (Section 3.4, page 94), des inhibiteurs de xylanases recombinants ont été produits avec succès et ont montré une activité d'inhibition similaire à celle observée sur les protéines natives. Le système levure, dans *P. pastoris*, a aussi montré de bons résultats en terme d'expression protéique pour les protéines de type TAXI, TLXI et XIP-I [Fierens et al., 2004, Durand et al., 2005, Raedschelders et al., 2005, Fierens et al., 2007]. La production en *E. coli* pour certaines d'entre elles [Fierens et al., 2003, Takahashi-Ando et al., 2007, Weng et al., 2010] tend à souligner la faible importance du facteur glycosylation dans la fonction d'inhibition. La faible stabilité observée pour XIP-I est par ailleurs corrélée avec l'absence de glycosylation [Elliott et al., 2002]. Néanmoins, on peut noter que l'expression de TAXI-III dans *E. coli* apparaît être très faible [Igawa et al., 2004]. L'analyse de la séquence a ensuite révélé la présence de codons rares et l'utilisation d'une protéine fusion (souche d'*E. coli* Origami™) a permis d'obtenir une protéine partiellement purifiée et une activité d'inhibition [Igawa et al., 2004]. La glycosylation a montré son importance quant aux interactions entre les PGIPs and PGs. Une PGIP d'haricot ayant été exprimée sur plant de tomate a perdu sa capacité à inhiber les PGs de *F. moniliforme*. Une PGIP du citron a, quant à elle, été exprimée dans *E. coli* sans que son activité d'inhibition ne soit perdue, diminuant ainsi de 60 % l'activité des PGs d'*A. niger* [Nalumpang et al., 2002]. L'importance de la glycosylation est ainsi sujette à discussion et est surtout dépendante de la protéine étudiée.

En comparant les structures tridimensionnelles de TAXI-I et celles prédites des inhibiteurs, il apparaît que la position du centre actif est identique (Figure 4.11a, page 121). Les sites de glycosylation se trouvent sur la face opposée au centre actif de TAXI-I (Figure 4.11b, page 121). En supposant que les interactions des enzymes cibles soient similaires avec celles de TAXI-I, on peut s'attendre à ce que les glycosylations n'interfèrent pas avec ces interactions [Naqvi et al., 2005]. De même, il a été montré chez les protéines de type PGIP que la position des sites de glycosylation, spécialement dans la région des hélices- α , était importante dans l'activité inhibitrice [Protsenko et al., 2008]. Or dans le cas de nos inhibiteurs, leur position ne se trouve pas dans une région en hélices- α . En outre, comme

évoqué en chapitre 2 (Tableau 2.8, page 54), le nombre de sites potentiels de glycosylation est différent chez toutes les protéines considérées, suggérant également que la glycosylation ne soit pas cruciale pour les activités d'inhibition des XEGIPs.



(a) Superposition des structures tridimensionnelles prédites d'une protéine de type TAXI et des inhibiteurs de houblon.

(b) Position des sites de glycosylation (en rouge) sur la structure tridimensionnelle prédites de l'inhibiteur n° 1.

Figure 4.11 – Position du centre actif des inhibiteurs de houblon par superposition avec un inhibiteur de type TAXI-I (structure PDB : 1T6GB) et mise en évidence de la position des sites de glycosylation en position opposée au centre actif. Les flèches en figure 4.11a indiquent la position du centre actif de TAXI-I. Les structures tridimensionnelles sont représentées en rouge, vert, bleu et orange, respectivement pour TAXI-I, l'inhibiteur n° 1, l'inhibiteur n° 2 et l'inhibiteur n° 3.

Par ailleurs, la comparaison des poids moléculaires théoriques et ceux observés (sur gel SDS-PAGE ou par MALDI-MS) sur plusieurs protéines de type XEGIP montre des différences de 6 625 kDa pour la XEGIP de la tomate [Qin et al., 2003], de 9 000 kDa pour l'EDGP de la carotte [Sato et al., 1992] ou encore de 15 400 kDa pour la NEC4 du tabac [Naqvi et al., 2005], permettant de suggérer qu'au moins un des sites potentiels doit être glycosylé. Une étude de l'importance de la glycosylation a été menée sur la XEGIP de la carotte [Shang et al., 2005]. La déglycosylation de cette protéine a occasionné une perte de l'activité d'inhibition. Les modifications post-traductionnelles se sont révélées essentielles pour une bonne conformation protéique ainsi que pour la sécrétion. Dans le cas des XEGIPs du houblon produites en cellules d'insectes, il serait possible d'envisager l'action d'enzymes (telles que des glycosidases) afin de déglycosyler les inhibiteurs. La visualisation d'un écart de poids moléculaire entre des protéines sans traitement et des protéines déglycosylées permettrait de confirmer la présence de ces modifications post-traductionnelles. Des tests enzymatiques d'inhibition avec le Viscozyme seraient alors à envisager et pourraient nous renseigner sur l'importance de la glycosylation pour les inhibiteurs de houblon.

4.4.2 Résidus impliqués dans l'inhibition des XEGIPs de houblon

Les tests enzymatiques effectués dans ce chapitre à partir des protéines exprimées en cellules d'insectes ont montré des divergences dans la capacité d'inhibition des trois XEGIPs du houblon. Ainsi l'inhibiteur n° 3 s'est révélé incapable d'inhiber les enzymes testées, contrairement aux inhibiteurs n° 1 et n° 2. Ces différences peuvent être dues aux propriétés intrinsèques des protéines ou être dépendantes de l'expression protéique en cellules d'insectes. Il s'agit dans cette partie d'émettre des hypothèses pouvant expliquer ces différences en se basant notamment sur les structures tridimensionnelles et la localisation des centres actifs de ces inhibiteurs. Ces derniers ont été définis par analogie avec les mécanismes d'inhibition des protéines de type TAXI. Bien que discutable du fait qu'il soit possible que les XEGIPs aient un mécanisme différent et/ou impliquant d'autres résidus, il nous a paru intéressant d'associer ces structures prédites à nos réflexions. Certains auteurs se basent d'ailleurs sur ces structures pour argumenter leurs propos [Scarafoni et al., 2010, Yoshizawa et al., 2011].

Plusieurs études ont pu déterminer les mécanismes d'inhibition des protéines de type TAXI [Sansen et al., 2004, Raedschelders et al., 2005, Pollet et al., 2009b] et notamment l'emplacement des résidus clés de l'inhibition. Ainsi pour les protéines TAXI-I, la présence du résidu histidine en position 374, positionnée dans le centre actif de l'enzyme, interagit avec les deux résidus catalytiques des xylanases, à savoir deux résidus acides glutamiques. Elle permet en outre de stabiliser le complexe. En position 292, un résidu leucine joue un rôle primordial dans la spécificité d'inhibition, en imitant parfaitement la position du xylose dans le site actif. L'importance de ces deux résidus, His₃₇₄ et Leu₂₉₂, a été confirmée sur TAXI-II, dont l'inhibition est effective sur une xylanase de la famille des GH11 *Bacillus subtilis* mais réduite envers une xylanase d'*A. niger*. Les séquences protéiques de TAXI-II varient de celles de TAXI-I au niveau de ces résidus. La mutation des résidus Pro₂₉₄ et Gln₃₇₆, respectivement pour TAXI-IIA et TAXI-IIB, pour former le couple His / Leu de TAXI-I, a permis d'obtenir l'inhibition de la xylanase d'*A. niger*. Les interactions de la Leu₂₉₂ et de la Pro₂₉₄ avec les résidus de xylanase sont cruciales à la fois pour l'inhibition et pour la spécificité. La figure 4.12 (page 123) permet de visualiser ces résidus par l'illustration de l'interaction entre une TAXI et une GH11 d'*A. niger*.

Un agrandissement de la figure 4.11a (page 121) est présenté en figure 4.13a (page 124) et suggère la conservation des résidus intervenant dans l'inhibition et la spécificité des enzymes. L'alignement protéique en figure 4.13b (page 124) nous informe que le résidu histidine en position 374 de TAXI-I correspond pour chaque inhibiteur à un résidu arginine, acide aminé également basique et capable de former des interactions avec les acides aminés chargés négativement comme l'acide glutamique. Le résidu leucine en position 292 de TAXI-I correspond également, chez les inhibiteurs de houblon, à un résidu arginine. On constate d'ailleurs la même chose pour l'ensemble des XEGIPs (tomate, tabac ou carotte). Ces deux acides aminés (Leu et Arg) ont des propriétés en terme d'hydrophobicité, de polarité et de charge totalement différentes. Ces divergences peuvent d'ores et déjà être mises en parallèle avec la spécificité des XEGIPs à inhiber les GH12 et non les GH11 [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005]. La figure 4.13c (page 124) met en évidence la localisation des résidus His₃₇₄ et Leu₂₉₂ de TAXI-I et ses équivalents pour l'inhibiteur n° 2. L'encombrement stérique de ces résidus apparaît clairement différent entre ces deux protéines. La comparaison de la position de ces résidus au niveau des trois inhibiteurs de houblon en figure 4.13d (page 124) laisse apparaître un parfait alignement pour l'inhibiteur n° 1 et l'inhibiteur n° 2. En effet, les acides aminés à proximité des deux résidus arginine clés de l'inhibition sont les mêmes ou de la même famille (Figure 4.13b, page 124). Les résidus glycine et asparagine en position 313 et 314 de l'inhibiteur n° 1, c'est-à-dire dans l'environnement proche de la première

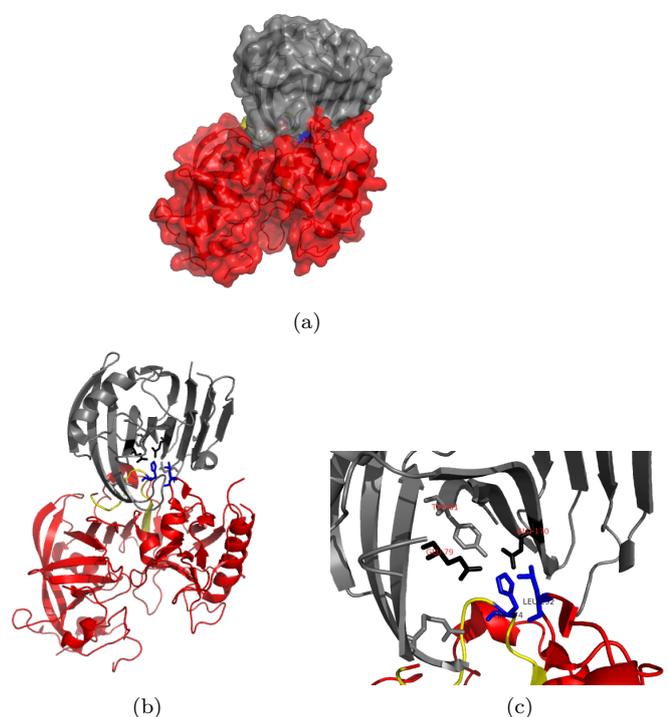


Figure 4.12 – Visualisation tridimensionnelle de l’interaction entre un inhibiteur de type TAXI-I (en rouge) et une GH11 d’*A. niger* (en gris) (Structure PDB : 1T6G). Les résidus importants dans le cadre des interactions sont mis en évidence sous forme d’une représentation en bâtonnets. En jaune apparaît une région de l’inhibiteur connue pour jouer un rôle dans la spécificité de l’inhibition. En bleu, apparaissent les résidus clés de l’inhibition, His₃₇₄ et Leu₂₉₂, qui interagissent avec les deux résidus catalytiques de la xylanase : Glu₇₉ et Glu₁₇₀ (en noir). Des interactions supplémentaires existent également entre le résidu His₃₇₄ de TAXI-I et les résidus Asp₃₇, Tyr₈₁ et Arg₁₁₅ de la xylanase (en gris).

arginine du centre actif, correspondent à deux sérines pour l’inhibiteur n° 2. Ces trois acides aminés sont de petites tailles, la glycine et la sérine étant des résidus dits flexibles. On peut néanmoins noter le caractère apolaire de la glycine contrairement à la sérine. Il est possible que ces légères divergences expliquent la plus faible capacité d’inhibition de l’inhibiteur n° 1 par rapport à l’inhibiteur n° 2. Du côté de la seconde arginine en position 415, l’ensemble des acides aminés de l’inhibiteur n° 1 et de l’inhibiteur n° 2 est identique. Pour l’inhibiteur n° 3, on constate des divergences avec les deux premiers inhibiteurs dans l’environnement proche des deux résidus arginine, entraînant comme suggéré en figure 4.13d (page 124) une conformation du centre actif différente. Ces modifications peuvent également être à l’origine de poches de nature hydrophobe ou hydrophile selon les inhibiteurs, pouvant gêner, dans le cas de l’inhibiteur n° 3, l’inhibition des enzymes. Le calcul des pI locaux (au niveau des résidus impliqués dans les phénomènes d’inhibition) ne permet pas de nous éclairer sur l’absence d’inhibition de l’inhibiteur n° 3. D’ailleurs, bien que le pH puisse influencer sur la capacité inhibitrice des inhibiteurs, une baisse de celui n’a pas permis de mettre en évidence l’activité inhibitrice de l’inhibiteur n° 3. Il est intéressant de remarquer que la protéine « XEGIP-like » de *L. albus* (la conglutine- γ) n’a pour l’heure pas montré de capacité inhibitrice contre les GH12 [Scarafoni et al., 2010] et ce pour des raisons qui semblent différentes de celles évoquées précédemment pour l’inhibiteur n° 3. En effet, la comparaison de la séquence protéique

avec celle de TAXI-I ainsi que d'autres XEGIPs (notamment celle de la tomate et du tabac ornemental [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005]) a montré une délétion de cinq acides aminés pouvant ainsi causer une conformation spatiale défavorable. D'ailleurs, comme abordé en section 2.3.3.3 (page 56), il est probable que cette protéine ne soit pas une XEGIP et qu'elle n'ait pas de fonction inhibitrice.

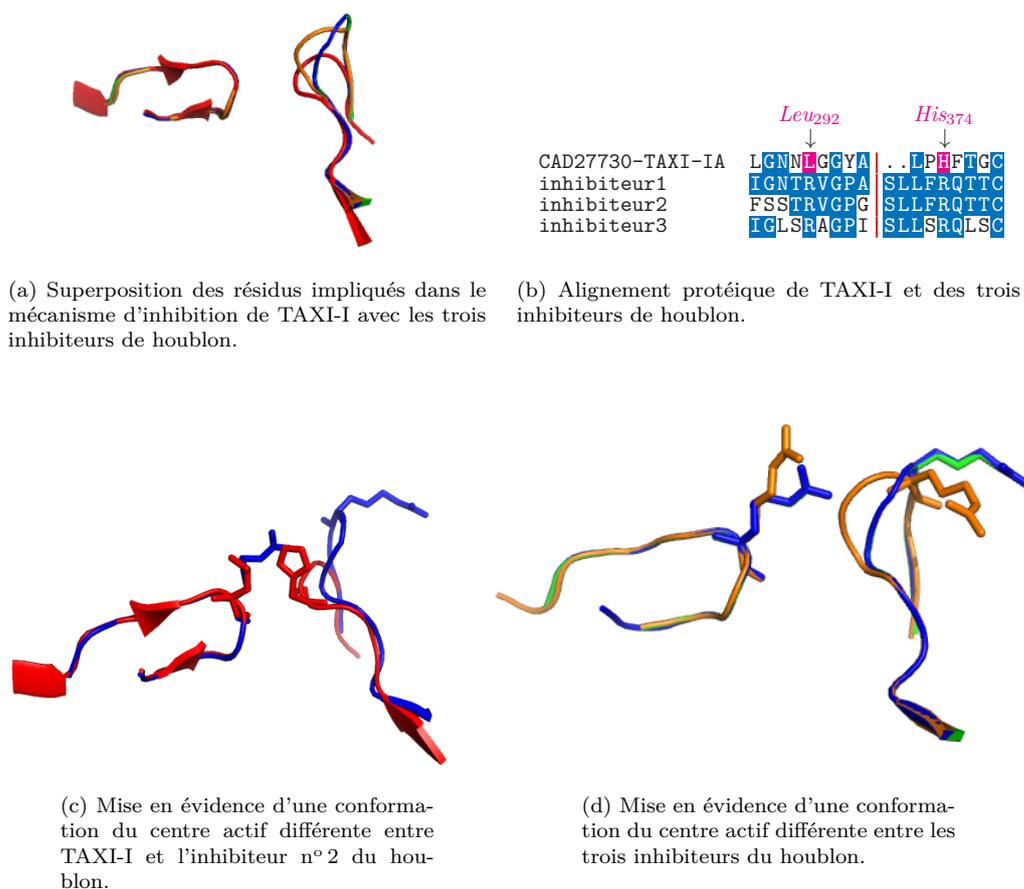


Figure 4.13 – Comparaison des résidus impliqués dans la capacité inhibitrice de TAXI-I (Structure PDB : 1T6GB) et des inhibiteurs de houblon. Les structures tridimensionnelles sont représentées en rouge, vert, bleu et orange, respectivement pour TAXI-I, l'inhibiteur n° 1, l'inhibiteur n° 2 et l'inhibiteur n° 3.

4.4.3 Capacité d'inhibition et enzymes cibles

L'utilisation du Viscozyme a permis de se placer dans les conditions proches des interactions enzyme / inhibiteur réalisées sur la XEGIP de la tomate ou celle du tabac [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005]. Tout comme les précédentes études, des inhibitions ont été observées sur l'activité enzymatique de xyloglucanases d'*A. aculeatus*, de l'ordre de 95 % pour l'inhibiteur n° 2. La différence à souligner dans ce projet est l'utilisation d'inhibiteurs recombinants, faisant de cette étude une première dans le domaine des XEGIPs. Les interactions entre ces inhibiteurs recombinants et des enzymes de *F. graminearum* ont pu, pour la première fois, montrer l'inhibition de xyloglucanases. L'inhibiteur n° 2 (60 µg de surnageant de culture en cellules d'insectes) a ainsi réduit l'activité enzymatique des surnageants de *F. graminearum*, de 40 % à 75 % selon le milieu sur lequel le champignon a poussé. Les études en spectrométrie de masse apportent avec exactitude la présence de GH12 dans ces cocktails enzymatiques.

Les interactions entre les GH12 de *F. graminearum* clonées ainsi que les GH10 et GH11 avec les inhibiteurs n'ont pas permis d'obtenir les résultats escomptés, c'est-à-dire une inhibition pour les GH12 de *F. graminearum* et une absence d'inhibition pour les GH10 et GH11. Dans les deux cas, l'ajout des inhibiteurs a conduit à un effet activateur de la réaction enzymatique. La nature recombinante de ces enzymes pourrait être la cause de cet effet activateur. Néanmoins, l'interaction entre ces inhibiteurs et un surnageant de culture de *F. graminearum* sur un milieu à base de bouleau montre des résultats similaires. La présence de métaux ou d'autres composés dans les surnageants de culture de baculovirus a été écartée comme cause potentielle du fait de la dialyse effectuée sur les échantillons protéiques avant les tests d'inhibition. Pour l'heure, le phénomène « activateur » des inhibiteurs du houblon sur les enzymes GH12 clonées reste inexpliqué. Il est possible que des tests d'inhibition effectués avec les inhibiteurs purifiés puissent améliorer et résoudre ce problème d'ordre technique. Des travaux sur les protéines purifiées pourront également permettre la mise en place de co-immunoprécipitation sur les surnageants de culture de *F. graminearum* afin de mettre en évidence les enzymes cibles inhibées, à savoir les GH12 de *F. graminearum*.

4.4.4 Les GH12 de *F. graminearum*, cibles potentielles des XEGIPs

La recherche d'enzymes cibles mise en place dans le cadre de ce projet a néanmoins permis de caractériser quatre GH12 de *F. graminearum*, qui n'avaient pas été étudiées auparavant. En 2009, une étude a d'ailleurs montré que le nombre de séquences dans les bases de données de CAZy avait doublé en deux ans, alors que les informations structurales et biochimiques n'ont que très peu augmenté (8 %) [Cantarel et al., 2009]. Une analyse des résultats obtenus sur ces GH12 est présentée ci-dessous.

Les familles GH, définies par la base de données de CAZy, décrivent les enzymes d'une même famille comme ayant une structure tridimensionnelle, et en particulier un centre actif, unique [Henrissat and Bairoch, 1993]. Néanmoins, de grandes divergences existent après comparaison protéique des GH12 aussi bien entre des enzymes d'origine procaryote et celles d'origine eucaryote, mais également entre enzymes fongiques [Goedegebuur et al., 2002]. Les quatre GH12 de *F. graminearum* exprimées lors de ce projet ne dérogent pas à cette règle, avec une similarité de ces protéines comprise entre 41,8 % à 53,1 %. Les similarités sont plus grandes entre FG11037 et la GH12 de *F. equiseti* (Q8NJZ4) avec 82,2 % et les deux GH12 d'*Aspergillus* (AAD02275 et ABF46829) 88,3 % de similarités. Toutefois, les GH12 présentent deux motifs homologues contenant les résidus du centre actif : deux acides glutamiques

[Goedegebuur et al., 2002]. Il a été montré que la présence de la méthionine, dans la première zone homologue, avait un rôle important dans le centre actif avec une activité faible ou non spécifique en cas de substitution. Dans cette même zone, le tryptophane aurait quant à lui un rôle dans la fixation de l'enzyme avec le substrat [Goedegebuur et al., 2002]. Ces zones homologues sont également conservées pour les GH12 de *F. graminearum* comme le montre la figure 4.14a (page 127) représentant l'alignement des GH12 mentionnées ci-dessous. Malgré les similarités des centres actifs des GH12 de *F. graminearum* avec celle d'*A. aculeatus*, il est possible que la présence de ces acides aminés empêche les inhibiteurs d'atteindre le centre actif des enzymes et d'inhiber la réaction enzymatique. Néanmoins, il n'est pas nécessaire qu'un inhibiteur agisse sur le centre actif pour causer une perte d'activité. Il peut en effet provoquer une déformation de l'enzyme la rendant inactive. De plus, l'hypothèse de l'encombrement stérique ne permet pas d'expliquer le phénomène activateur des inhibiteurs.

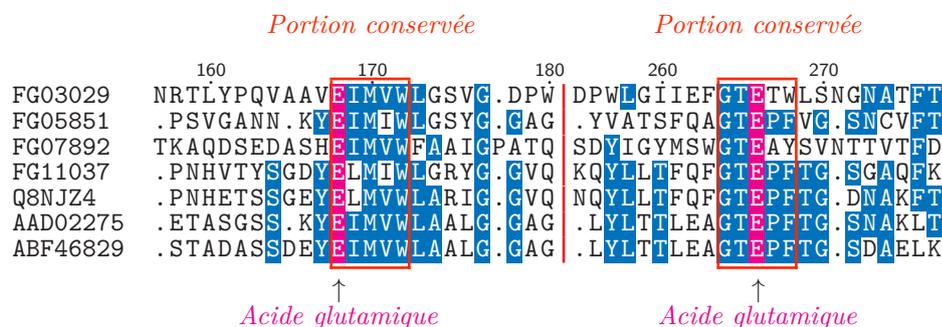
Les différences observées en terme d'activité entre les quatre GH12 de *F. graminearum* peuvent s'expliquer par des acides aminés différents dans la proximité du second résidu acide glutamique : une phénylalanine dans le cas des enzymes les plus actives (FG05851 et FG11037), acide aminé apolaire et aromatique; un tryptophane pour FG03029, acide aminé polaire mais présentant deux cycles soit un encombrement stérique beaucoup plus important pouvant gêner le centre actif; une tyrosine pour FG07892, acide aminé polaire contrairement à la phénylalanine, pouvant ainsi influencer la capacité d'hydrolyse de l'enzyme. La figure 4.14c (page 127) présente la position de deux acides glutamiques impliqués dans l'hydrolyse enzymatique.

L'étude de ces enzymes a permis de mettre en évidence une régulation allostérique pour une des GH12 (FG11037), mécanisme inconnu chez cette famille et à notre connaissance chez les glycosyde hydrolases. La recherche d'effecteur(s) est à l'étude. De plus, des analyses par PACE ont montré que les résidus dégradés étaient sensiblement différents pour trois des quatre GH12 clonées, permettant de les classer parmi trois sous-familles connues des GH12 [Goedegebuur et al., 2002].

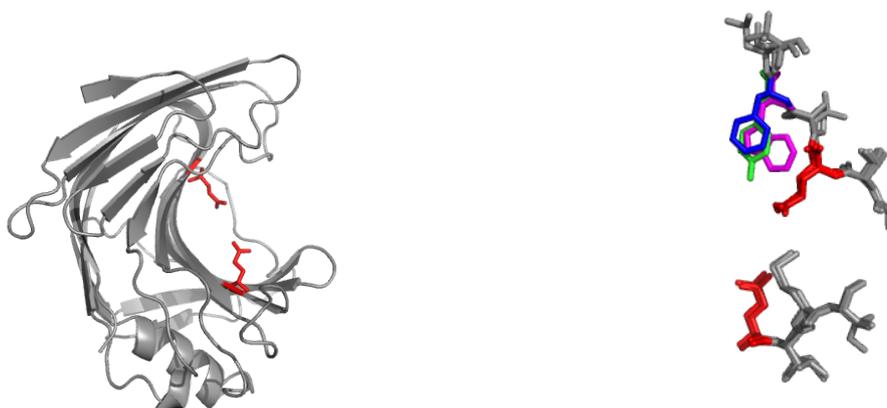
La disponibilité des anticorps polyclonaux a permis d'envisager l'utilisation de techniques de co-immunoprécipitation pour identifier d'éventuelles enzymes cibles. Néanmoins comme nous avons pu le voir en chapitre 3 (Section 3.3.1.1, page 80) des difficultés ont été rencontrées lors de leur utilisation. L'arrivée tardive des anticorps monoclonaux n'a pas permis leur utilisation dans le cadre de ce doctorat, mais pourra être envisagée ultérieurement. Il s'agira dans un premier temps de valider que les enzymes de *F. graminearum* inhibées par les inhibiteurs produits dans baculovirus, correspondent aux GH12 clonées (FG11037 et FG05851). Pour cela, les inhibiteurs seront mis en contact avec les surnageants de culture de *F. graminearum* et le complexe obtenu purifié grâce aux anticorps monoclonaux fixés sur colonne. L'éluion du complexe et l'analyse des échantillons en SDS-PAGE (incluant les contrôles négatifs) permettra de mettre en évidence les enzymes cibles des inhibiteurs. Dans un second temps, des surnageants provenant de divers champignons pourront être mis en contact avec les inhibiteurs afin de détecter éventuellement d'autres enzymes d'une famille différente de celle des GH12.

4.4.5 XEGIPs de houblon et défense de la plante

Les inhibiteurs ont montré leur capacité à réduire l'activité enzymatique des xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanases de *A. aculeatus* et de *F. graminearum*. Chez *A. aculeatus*, sept endoglucanases, incluant des cellulases et des XEG, ont été identifiées. Bien que ce



(a) Alignement protéique de différentes GH12. FG03029, FG05851, FG07892 et FG11037 : GH12 de *F. graminearum*. Q8NJZ4, GH12 de *F. equiseti*. AAD02275 et ABF46829, respectivement GH12 d'*A. niger* et *A. aculeatus*. En bleu apparaissent les résidus conservés à plus de 50 %. Les portions encadrées en rouge correspondent aux portions conservées par la plupart des GH12. Les résidus (acide glutamique) du centre actif sont mis en évidence en magenta.



(b) Position du centre actif de FG05851 et mise en évidence des deux résidus d'acide glutamique (en rouge).

(c) Alignement des résidus du centre actif des quatre GH12 de *F. graminearum*. En rouge est représenté les acides glutamiques conservés. La tryptophane de FG03029 est représenté en magenta, la tyrosine de FG07892 en vert et les phénylalanine de FG05851 et de FG11037 en bleu.

Figure 4.14 – Alignement et centre actif de GH12 dont celles de *F. graminearum*.

champignon ne soit pas considéré comme un pathogène mais plutôt comme un saprophyte, le spectre des enzymes qu'il sécrète est similaire à ceux des champignons pathogènes comme *F. graminearum* [de Vries and Visser, 2001]. Les GH12 d'*A. aculeatus* ont pu être inhibées par les XEGIPs de la tomate [Qin et al., 2003] et du tabac ornemental [Naqi et al., 2005]. Des XEGs de *Cladosporium fulvum* ont également pu être inhibées par les XEGIPs de la tomate [Qin, 2003]. De par leur capacité à inhiber certaines des CWDEs produites par les champignons, il est généralement attribué aux XEGIPs un rôle dans les processus de défenses de la plante. Récemment une étude a montré que les interactions entre NEC4 et une endoglucanase d'origine fongique jouait un rôle important dans la défense de la plante. En effet, le complexe de NEC4 / XEG permettrait d'induire l'activité de NEC5 (une glucose oxydase), augmentant ainsi les concentrations en composés impliqués dans le stress oxydatif (H_2O_2) [Harper et al., 2010]. Ainsi, en plus de leur capacité à reconnaître et à inactiver des

enzymes de pathogènes, les XEGIPs pourraient, de par la formation de complexes, être à l'origine de l'activation d'une cascade de réactions visant à la défense de la plante.

La nécessité supposée des glycosylations nous a amené à envisager le travail à partir de protéines natives, c'est-à-dire des protéines purifiées à partir de la plante. Outre la possibilité d'obtenir des informations sur la nature protéique de ces XEGIPs de houblon (pI, isoprotéines, expression différentielle), des travaux sur les protéines natives permettraient de tester les capacités d'inhibition de ces protéines et la possibilité de trouver de nouvelles enzymes cibles.

Par ailleurs, bien que la fonction des inhibiteurs ait été démontrée, plusieurs interrogations quant à la possible relation entre les XEGIPs et la défense de la plante restent en suspens. De nombreuses preuves ont pu permettre de corréler les inhibiteurs de xylanases avec leur rôle dans la défense de la plante [Dornez et al., 2010]. On peut alors s'interroger sur l'expression des inhibiteurs du houblon lorsque la plante est mise en contact avec un pathogène tel que *F. graminearum*. Les inhibiteurs sont-ils induits lors de blessures comme les inhibiteurs de type TAXI chez le blé [Igawa et al., 2005] ou l'EDGP de la carotte [York et al., 2004] ? Un travail sur la plante nous a semblé nécessaire pour répondre à ces questions. Que ce soit en terme de distribution temporelle ou d'induction au stress, peu d'études ont été réalisées sur les XEGIPs et le chapitre suivant permettra d'apporter des réponses sur les caractéristiques de ces protéines de houblon.

TRAVAUX SUR LA PLANTE

Sommaire

5.1	Introduction	131
5.2	Matériels et Méthodes	132
5.2.1	Matériels biologiques	132
5.2.1.1	Plants de houblon	132
5.2.1.2	Champignons	132
5.2.2	Analyse protéique	133
5.2.2.1	Extraction protéique	133
5.2.2.2	Analyse des protéines	133
5.2.2.3	Techniques visant à la suppression de la RuBisCO dans les extraits protéiques du houblon	133
5.2.3	Immunodétection	134
5.2.4	Matériels génomiques	134
5.2.5	PCR	134
5.2.6	PCR quantitative	134
5.2.6.1	Aspects généraux	134
5.2.6.2	Amorces des inhibiteurs et gène de référence	135
5.2.6.3	Calcul de l'expression des gènes	136
5.2.7	Bioessais et validation des postulats de Koch	136
5.2.8	Expression des gènes chez le houblon	136
5.2.9	Expression des gènes face à un stress abiotique et un stress biotique	137
5.3	Résultats	138
5.3.1	Bioessais et postulats de Koch	138
5.3.2	Expression protéique des inhibiteurs du houblon	140
5.3.3	Méthodes utilisées pour la suppression de la RuBisCO	140
5.3.3.1	Technique immunologique	141
5.3.3.2	Utilisation du PEG	141
5.3.3.3	Utilisation du couple acide phytique et chlorure de calcium	142
5.3.4	Mise en place de la PCR quantitative	144
5.3.4.1	Spécificité des amorces	144
5.3.4.2	Analyse des données	145
5.3.5	Expression des inhibiteurs	146
5.3.5.1	Etude de l'expression relative des inhibiteurs selon les variétés	147
5.3.5.2	Etude de l'expression relative des inhibiteurs lors de la germination	149
5.3.5.3	Etude de l'expression spatiale relative des inhibiteurs	151

5.3.5.4	Etude de l'expression relative des inhibiteurs face à un stress abiotique et biotique	153
5.4	Discussion	158
5.4.1	Distribution spatiale et temporelle des inhibiteurs	158
5.4.2	Stress abiotique et stress biotique	159
5.4.3	Rôle des inhibiteurs	161

5.1 Introduction

Les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence, à partir d'une EST, trois gènes codant des inhibiteurs de xyloglucanase communément nommés XEGIP. Les tests enzymatiques ont validé la fonction pour les inhibiteurs n° 1 et n° 2 du houblon, c'est-à-dire leur capacité à inhiber les enzymes de la famille des GH12.

Le choix a été fait de travailler sur la plante et cette voie ouvre plusieurs possibilités, notamment celle de travailler avec les protéines natives. Comme décrit dans le chapitre 4, l'inhibiteur n° 3 n'a pas été en mesure d'inhiber les enzymes de *A. aculeatus* et de *F. graminearum*. Il est envisageable que la cause soit la production en baculovirus. Auquel cas, des tests avec les protéines natives pourront être en mesure de confirmer ou de réfuter cette hypothèse. Pour les deux autres inhibiteurs, il sera question de travailler sur leur activité inhibitrice. La purification pourra ainsi permettre de confirmer la fonction des protéines (par la mise en place de tests d'inhibition), de déterminer leurs caractéristiques (poids moléculaires, pI, mise en évidence des différents homologues par gel bidimensionnel), leur stabilité et ce en étant le plus proche possible du contexte hôte / pathogène.

En second temps, des travaux sur plantes permettent dans le contexte hôte / pathogène de valider les postulats de Koch, principe nécessaire en phytopathologie destiné à établir la relation de cause à effet liant un microorganisme et une maladie. De plus, la possibilité de soumettre la plante à plusieurs stress ouvre la possibilité de travailler sur l'expression des gènes codant des inhibiteurs. La mise en place de la technique de la PCR quantitative va ainsi permettre cette étude d'expression, et ce dans plusieurs conditions : lors de la germination, selon les variétés, lors de blessures occasionnées sur la plante ou encore lors d'inoculation de spores fongiques. La corrélation possible entre les inhibiteurs et les réactions de défense pourra ainsi être discutée.

5.2 Matériels et Méthodes

5.2.1 Matériels biologiques

5.2.1.1 Plants de houblon

Dans le cadre de ce chapitre, plusieurs variétés ont été utilisées. Les variétés Strisselspalt, Fuggle, Savinjski Golding ont été généreusement fournies par la COPHOUDAL. La variété sauvage est issue de graines de plants sauvages (bord de la Bruche, Molsheim, prélèvements en septembre 2008). Les plants de la sélection variétale (programme international décrit en section 1.3.3, page 33) sont des plants mâles issus de croisement de l'année 2010 en godet de terre et nommés Sélection variétale.

Dans le but de bénéficier de plants ayant le même patrimoine génétique, les différentes variétés (à l'exception de ceux de la sélection variétale 2010) ont été multipliées par culture de tissus. Des portions de tiges comprenant un noeud sont prélevées sur les pieds de houblon puis désinfectées par un cycle d'eau de javel (20 min), puis trois rinçages de 5 min à l'eau stérile. Les tissus végétaux sont alors placés dans un milieu gélosé dit de régénération, permettant la formation de cals. Les tissus sont alors placés dans un second milieu dit de micropropagation. Les plants sont multipliés par bouturage, c'est-à-dire par dépôt sur le milieu gélosé d'une portion de tige comprenant au moins un noeud. La composition des milieux est décrite ci-dessous et a été fournie par l'université de Ljubljana, Slovénie, basée sur les travaux de Batista et collaborateurs [Batista et al., 1996] :

Milieu de régénération :

MS basal salt mixture à 4,3 g/l
 Inositol à 0,1 g/l
 Glucose à 20 g/l
 Thiamine à 0,1 mg/l
 Pyridoxine à 0,5 mg/l
 Acide nicotinique à 0,5 mg/l
 6- γ - γ (dimethylallylamino)-purine à 6 mg/l
 Acide indole-3-acétique à 0,025 mg/l
 Glycine à 2 mg/l
 Agar à 8 g/l
 pH 5,8

Milieu de micropropagation :

MS basal salt mixture à 4,3 g/l
 Inositol à 0,1 g/l
 Glucose à 20 g/l
 Thiamine à 0,1 mg/l
 Pyridoxine à 0,5 mg/l
 Acide nicotinique à 0,5 mg/l
 6-benzylaminopurine à 1 mg/l
 Agar à 8 g/l
 pH 5,8

Les plants sont placés à 25 °C, sous une photopériode de 16 h de jour/8 h de nuit.

5.2.1.2 Champignons

Les champignons sont récoltés lors du suivi de la charge fongique en houblonnière, sur des plants de houblon en dépérissement (Section 1.3.3, page 33). Les plants de houblon sont inoculés à partir d'une suspension de spores (1.10^5 spores).

5.2.2 Analyse protéique

5.2.2.1 Extraction protéique

Les tissus de houblon (feuilles, tiges, racines, graines, cônes) sont broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon, auquel est ajouté du sable de Fontainebleau ainsi que du tampon phosphate (50 mM, pH 7) en volume variable.

5.2.2.2 Analyse des protéines

Les protéines sont analysées comme décrit dans la section 3.2.7 du chapitre 3 (page 74).

5.2.2.3 Techniques visant à la suppression de la RuBisCO dans les extraits protéiques du houblon

Les premières analyses protéiques sur le houblon ont conduit à la nécessité de supprimer la RuBisCO (ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase) dans les échantillons. Pour ce faire, plusieurs techniques ont été réalisées.

La première a consisté à fixer un anticorps anti-rubisco (RbcL, Rubisco large subunit, form I and form II, Agrisera) sur une résine de type époxy (résine Profinity™ Epoxide, Bio-rad). Les protéines de houblon issues d'un broyat de feuilles sont équilibrées avec un tampon (50 mM de phosphate de potassium pH 6,5, 0,5 M de NaCl), puis mises en contact avec la résine. Après trois étapes de lavage (avec le tampon d'équilibration), les protéines sont éluées par un tampon acide (0,1 M de glycine-HCl, pH 2,8), puis analysées sur SDS-PAGE.

La suppression de la RuBisCO a également été réalisée par fractionnement au PEG (Polyéthylène glycol) [Acquadro et al., 2009]. À partir d'un surnageant de protéines (nommé surnageant 0, soit SN0) de feuilles de houblon, le PEG (4 000 ou 6 000, Sigma) est ajouté à une concentration finale de 10 % et l'ensemble est incubé pendant 15 min à 4 °C. Après centrifugation (15 min, 1 500 g), le culot est récupéré (culot 1) et le PEG est ajouté au surnageant (SN1) à une concentration finale de 20 %. Après incubation 15 min à 4 °C, puis centrifugation (15 min, 1 500 g), le culot (culot 2) et le surnageant (SN2) sont récupérés et analysés en SDS-PAGE. SN2 contient les protéines totales sans la RuBisCO, qui est précipitée et se retrouve dans le culot 2.

Le phytate a la capacité de se complexer avec les protéines, provoquant une baisse de leur solubilité. À un pH du milieu supérieur au pI de la protéine et en présence d'un métal alcalinoterreux, le complexe phytate-protéine aura la capacité de précipiter. Les tissus végétaux sont broyés par mortier et pilon, avec un tampon de broyage (50 mM Tris-HCl pH 6,8). L'échantillon protéique (après centrifugation du broyat 10 min à 13 000 g et récupération du surnageant) est mis en contact avec 10 mM de phytate et 10 mM de Ca²⁺, à 42 °C pendant 10 min. Après centrifugation (10 min, 13 000 g), les surnageants sont analysés en SDS-PAGE et/ou en western blot.

5.2.3 Immunodétection

Les techniques d'immunologie (western blots) sont décrites dans le chapitre 3 (Section 3.2.8, page 75). L'anticorps primaire anti-rubisco est utilisé à une dilution au 15 000^e.

5.2.4 Matériels génomiques

Les extractions d'ADN, d'ARN et la synthèse d'ADNc ont été effectuées selon les mêmes protocoles que ceux décrits en section 2.2.2.2 (page 38).

5.2.5 PCR

Les PCRs sont effectuées selon la réaction et le cycle ci-dessous. Les amorces sont définies dans le tableau 5.1 (page 135)

Réaction de PCR :

- 0,5 U Taq polymérase (TAQ POL)
- 1 X de PCR bufferB
- 2 mM de MgCl₂
- 0,5 μM de dNTPs
- 0,5 μM de chaque amorce
- H₂O qsp 50 μL

Cycle de la PCR :

- 5 min à 95 °C
- 45 sec à 95 °C
- 30 sec à 59 °C } 35 cycles
- 45 sec à 72 °C
- 10 min à 72 °C

5.2.6 PCR quantitative

5.2.6.1 Aspects généraux

Les essais en PCR quantitative sont réalisés sur l'appareil StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Les réactions individuelles se déroulent en plaques de 96 puits dans un volume de 20 μl contenant 1 x de tampon SYBR® Green PCR MasterMix (Applied Biosystems) et 0,5 μg de chaque amorce. Chaque détermination est réalisée en triplicat.

Sur la même plaque, des contrôles négatifs (des échantillons sans matériel génomique ou avec l'ARN reverse-transcrit en l'absence de reverse transcriptase) sont inclus lors de chaque analyse dans le but de détecter d'éventuelle contamination d'ADNg. Les amplicons de chaque échantillon sont vérifiés en terme de spécificité par l'analyse des courbes de fusion (présence d'un unique amplicon, absence de formation de dimère, pas d'amplification pour l'ARN). À la fin de chaque réaction, le seuil du cycle (nommé Ct pour *Cycle threshold*) est modifié manuellement afin de le positionner dans la partie linéaire de la courbe du logarithme de base (niveau reflétant les meilleurs paramètres de la PCR).

Le cycle de PCR est défini de la manière suivante :

- 8 min à 95 °C
- 15 sec à 95 °C
- 30 sec à 59 °C } 45 cycles
- 30 sec à 70 °C

5.2.6.2 Amorces des inhibiteurs et gène de référence

Trois jeux d'amorces des inhibiteurs ont été définis selon plusieurs critères en tenant notamment compte de la spécificité de chaque jeu d'amorces. Les séquences de ces amorces sont présentées en tableau 5.1 (page 135).

Les essais en PCR quantitative ont nécessité la présence d'un étalon interne, c'est-à-dire un gène constitutif (*housekeeping gene*), dans le but de calibrer les taux d'expression des gènes d'intérêt avec une quantité constante quelque soit la condition. Le gène de référence choisi est celui de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase (GAPDH). Précédemment utilisé sur le houblon [Nagel et al., 2008], une récente étude comparative de plusieurs gènes constitutifs sur cette plante, dans le cas d'une utilisation de PCR quantitative, a montré, par l'obtention de résultats fiables en PCR quantitative, la bonne adéquation de la GAPDH en tant que gène de référence [Maloukh et al., 2009]. Les informations concernant ce gène sont présentées dans le tableau 5.1 (page 135).

La spécificité de ces amorces a été contrôlée par séquençage des produits de PCR correspondant. Les résultats obtenus pour la GAPDH se sont révélés cohérents après BLAST, avec des scores inférieurs à $4e^{-30}$ pour des GAPDHs d'autres plantes (*A. thaliana* ou *Zea mays*).

Tableau 5.1 – Amorces utilisées lors du chapitre 5

Désignation	Séquence des amorces 5' → 3'	Gène cible	Taille de l'amplicon
qPCR_Inh1 f qPCR_Inh1 R	tgacctacgtccttga gcccaagagctttga	Inhibiteur n° 1	269 pb
qPCR_Inh2 f qPCR_Inh2 R	tcattcgtacaagcaca ggctctcgtcgaaga	Inhibiteur n° 2	263 pb
qPCR_Inh3 f qPCR_Inh3 R	actagcaccagtggcga aacgactccgtttgtgg	Inhibiteur n° 3	258 pb
GAPDH f GAPDH R	accggagccgactttgtttgaa tcgtactctgcttgattccttc	GAPDH	204 pb

5.2.6.3 Calcul de l'expression des gènes

Pour mesurer l'expression relative des gènes codant les inhibiteurs, la méthode du $\Delta\Delta Ct$ a été utilisée [Livak and Schmittgen, 2001]. Le $\Delta\Delta Ct$ est calculé comme suit :

$$\Delta\Delta Ct [Ct(\text{gène de controle}) - Ct(\text{gène de référence})] \\ - [Ct(\text{gène cible}) - Ct(\text{gène de référence})],$$

où le gène de référence est la GAPDH et le gène de contrôle, le gène utilisé pour normaliser les ADNc. Ce dernier sera défini pour chaque expérimentation. L'expression relative est définie par la formule suivante : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.2.7 Bioessais et validation des postulats de Koch

Les postulats de Koch ont été validés pour plusieurs champignons isolés de houblons malades. Les tests de pathogénicité ont été effectués soit sur feuilles de houblon, soit sur plants issus de la culture de tissus. Les inoculations sont réalisées à partir d'une suspension de spores (1.10^5 spores) et dans certains cas, à partir de mycélium. Les champignons sont ensuite ré-isolés sur milieu gélosé puis leur identité contrôlée.

5.2.8 Expression des gènes chez le houblon

L'expression des gènes codant les inhibiteurs a été envisagée en terme de distribution temporelle lors de la germination, de distribution spatiale et selon différentes variétés. Selon le gène utilisé comme gène de contrôle, deux modes d'interprétations seront possibles :

- l'expression des inhibiteurs s'interprète gène par gène et l'expression de l'inhibiteur n° 1 ne peut pas, par exemple, être comparé à celui de l'inhibiteur n° 2.
- le gène de contrôle est identique pour tous les gènes. Le gène de l'inhibiteur n° 1 a été choisi comme gène de contrôle. Il est ainsi possible de comparer l'expression d'un inhibiteur par rapport à un autre.

Des graines vernalisées de houblon, de souche sauvage, ont été hydratées dans une solution contenant de l'acide gibbérellique (1 g/l), afin d'améliorer leur efficacité germinative. Après 10 jours d'incubation, les graines sont mises à germer à 25 °C, avec une photopériode 16 h de jour. Un minimum de 100 mg de graines ont été prélevées afin d'effectuer les extractions d'ARN. Les stades de prélèvement sont illustrés en figure 5.1 (page 137) et sont définis ainsi :

- graines sèches vernalisées (Figure 5.1a) ;
- graines après réhydratation dans l'acide gibbérellique (temps J0, 1^{er} jour) (Figure 5.1a) ;
- graines en cours de germination (temps J2, 3^e jour) (figure 5.1a) ;
- graines au stade radicule (ce stade apparaît à partir du 5^e jour) (Figure 5.1b) ;
- graines au stade cotylédon (Figure 5.1c).

L'expression obtenue pour l'échantillon « graines sèches vernalisées » servira de gène de contrôle lors du calcul du $\Delta\Delta Ct$.

L'expression des gènes codant les inhibiteurs a également été analysée en fonction de la variété. Quatre variétés (Strisselspalt, Fuggle, sauvage et Savinjski Golding) en culture



Figure 5.1 – Photographies représentant les différents stades de prélèvement.

de tissus et un plant de la sélection variétale ont été analysés. La variété Strisselspalt a été utilisée pour quantifier les gènes de contrôle lors du calcul de l'expression relative des inhibiteurs.

Enfin, l'expression des gènes a été étudiée selon la distribution spatiale. Les parties étudiées correspondent aux graines, aux racines, aux tiges et aux feuilles issues d'un plant Strisselspalt d'environ 4 ans.

5.2.9 Expression des gènes face à un stress abiotique et un stress biotique

L'expression des gènes codant les inhibiteurs a été évaluée lors d'un stress abiotique (blessure) et d'un test biotique (inoculation de *F. graminearum*). Des essais préliminaires ont été effectués sur des plants de houblon Sélection variétale, au stade 8 feuilles (soit 4 noeuds). Le pied a été soit mis en contact avec du mycélium de *F. graminearum*, soit blessé par incision des feuilles. Le prélèvement des plants est effectué après 72 h de traitement. Ce temps a été défini par le dépérissement avancé du plant contaminé. D'autres plants (Sélection variétale et Fuggle) ont ensuite été soumis aux mêmes stress avec des prélèvements à différents temps (dont 72 h). Pour chaque stress, un plant non contaminé et un plant non blessé seront prélevés et utilisés pour quantifier les gènes de contrôle lors du calcul de l'expression relative des inhibiteurs. Les plants prélevés sont stockés à -80 °C avant l'extraction d'ARN.

5.3 Résultats

5.3.1 Bioessais et postulats de Koch

Dans le cadre des travaux du laboratoire sur le dépérissement du houblon, de nombreux champignons ont pu être isolés en houblonnières. Une vingtaine de genres a ainsi été mise en évidence [Phalip et al., 2006], avec plusieurs espèces connues comme étant pathogènes de plantes. Les premiers bioessais réalisés ont eu pour but de valider le caractère pathogène de certains isolats qui seront par la suite utilisés lors des expériences en PCR quantitative. Trois champignons isolés au laboratoire ont fait l'objet de cette étude : *F. graminearum* souche F9 GD Burgl 2C (2000), *Alternaria sp* souche ING E01 (2000) et *Sclerotinia sclerotinium* souche 04 TRU 13 (2004). Des feuilles de houblon sont inoculées par une suspension de spores et l'évolution des symptômes est observée. L'infection de *F. graminearum* sur feuilles de houblon est présentée en figure 5.2 et en 5.3 (page 138 et 139). On y observe deux types de propagation différentes. La première commence en début de nervure principale (Figure 5.2a), se propageant le long de celle-ci (Figure 5.2b) et gagnant progressivement les nervures secondaires (Figure 5.2c). La nécrose continue allant jusqu'au dessèchement complet de la feuille (Figure 5.2e). Le second mode de propagation a lieu par l'intermédiaire des blessures effectuées sur la feuille. Un halo marron apparaît progressivement autour des blessures (Figure 5.3b et 5.3c). Le champignon se propage ainsi et atteint une nervure secondaire (Figure 5.3d), améliorant ainsi la propagation vers des zones saines (Figure 5.3e). Au 13^e jour, l'infection a recouvert un lobe de la feuille (Figure 5.3f) et semble être délimitée par la nervure principale et une nervure secondaire, laissant supposer une défense de la plante avec par exemple la mise en place de bouchons de calose.

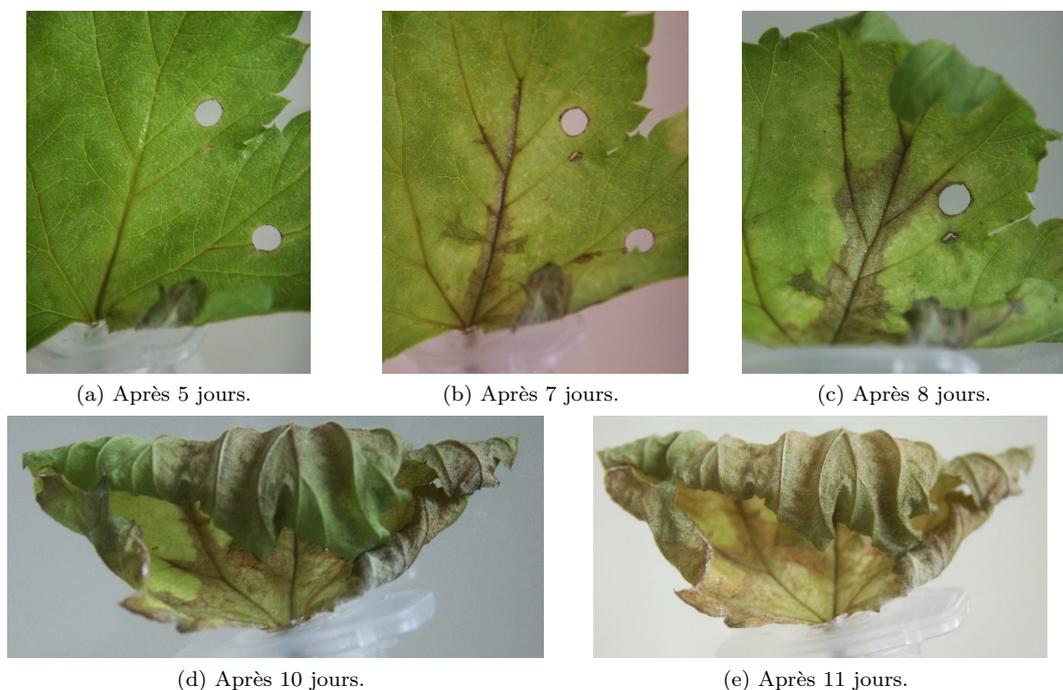


Figure 5.2 – Propagation de *F. graminearum* par la nervure principale sur une feuille de houblon.

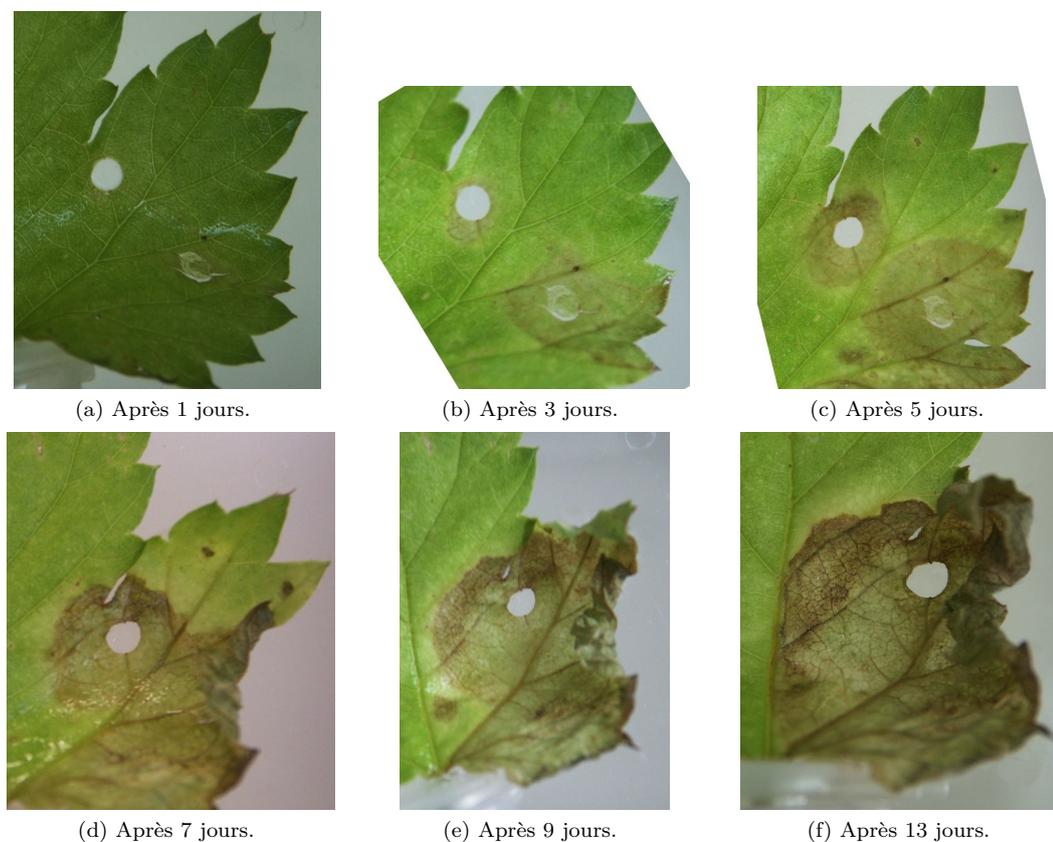


Figure 5.3 – Propagation de *F. graminearum* par une blessure sur une feuille de houblon.

Des travaux similaires ont été réalisés avec les champignons *Alternaria sp* et *Sclerotinia sclerotinium*. Les figures 5.4 et 5.5 (page 140) présentent ces champignons et mettent en évidence leur caractère pathogène sur le houblon.

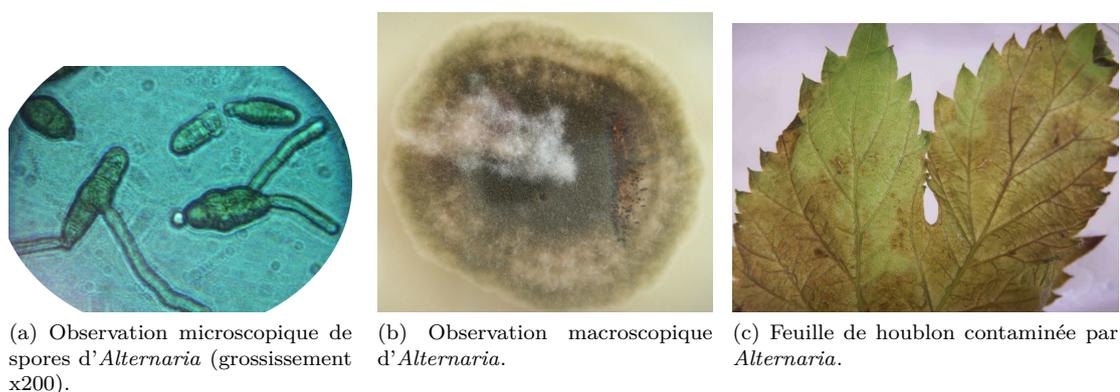


Figure 5.4 – *Alternaria sp.*



(a) Observation macroscopique de *Sclerotinia sclerotinium*.



(b) Feuille de houblon contaminée par *Sclerotinia sclerotinium*.

Figure 5.5 – *Sclerotinia sclerotinium*.

Ces champignons apparaissent comme des candidats éventuels aux tests d'expression des inhibiteurs face à un stress biotique (abordés en section 5.3.5.4, page 153). Du fait de l'utilisation de feuilles et non d'un plant entier, ces bioessais ne peuvent valider les postulats de Koch. Cette validation avec *F. graminearum* a été effective lors des tests d'expression des gènes codant les inhibiteurs (Section 5.3.5.4, page 153).

5.3.2 Expression protéique des inhibiteurs du houblon

Des premiers travaux ont eu pour but de visualiser les inhibiteurs en western blot à l'aide des anticorps polyclonaux. Plusieurs extraits protéiques (de racines, tiges, feuilles ou cônes), sous plusieurs conditions (issus des bioessais sains ou contaminés) ont été analysés en SDS PAGE puis l'occurrence des inhibiteurs évaluée par immunodétection. Seuls les échantillons protéiques de feuilles laissent apparaître en SDS-PAGE une protéine à la taille de 55 kDa (piste 1 de la figure 5.6, page 141) et un signal à une taille identique en western blot. La quantité importante de cette protéine, laisse supposer qu'il ne s'agit pas des inhibiteurs mais plutôt d'une autre protéine. Les résultats obtenus en gels bi-dimensionnel (données non montrées) tendent également vers cette hypothèse, avec la présence d'une bande protéique à un pI proche de 7 (pI attendu : 9). Une analyse par spectrométrie de masse nous a permis de confirmer cette hypothèse : la protéine majoritaire est la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO), enzyme clé dans la fixation du dioxyde de carbone par les plantes et protéine la plus abondante sur Terre [Feller et al., 2008]. Cette protéine interagit avec les anticorps polyclonaux et masque ainsi le signal spécifique aux inhibiteurs. La suppression de la RuBisCO est une étape nécessaire à l'étude protéique des inhibiteurs de houblon et fera l'objet des paragraphes suivants.

5.3.3 Méthodes utilisées pour la suppression de la RuBisCO

La RuBisCO est présente jusqu'à 50 % des protéines totales et rend difficile les analyses protéiques comme la détection de changements protéiques lors de l'étude de stress étudié par l'analyse de gel 2D [Hashimoto and Komatsu, 2007] ou la détection de protéines peu abondantes [Xi et al., 2006].

Plusieurs techniques sont employées pour supprimer ou soustraire la RuBisCO des échantillons :

- par fixation d’anticorps anti-RuBisCO sur une résine de type A-sépharose [Hashimoto and Komatsu, 2007]. Le passage de l’échantillon sur la colonne va entraîner la fixation de la RuBisCO sur celle-ci. L’échantillon sortant de la colonne serait alors exempt de toute RuBisCO.
- par fractionnement de l’échantillon par PEG (Polyéthylène glycol) [Kim et al., 2001, Xi et al., 2006, Acquadro et al., 2009] ;
- par l’utilisation d’acide phytique et de chlorure de calcium visant à précipiter la RuBisCO [Krishnan and Natarajan, 2009] :

Ces méthodes ont été utilisées pour la suppression de la RuBisCO dans le but de l’analyse des protéines de houblon en gel 2D et la purification des inhibiteurs de houblon à partir d’extrait protéique de houblon.

5.3.3.1 Technique immunologique

Cette technique, par la fixation d’un anticorps anti-rubisco sur une résine de type epoxy, ne s’est pas montrée concluante avec une quantité de RuBisCO fixée sur la colonne trop faible (de l’ordre de 10 %) pour envisager la suppression de cette protéine par cette méthode.

5.3.3.2 Utilisation du PEG

Les résultats obtenus par la technique du fractionnement au PEG 4000 sont présentés en figure 5.6 (page 141). Après la première précipitation, le surnageant récupéré (SN1, piste 2) présente le même profil que celui au temps initial (SN0, piste 1). Une faible quantité de RuBisCO a néanmoins été précipitée, comme l’atteste la présence d’une bande en piste 3 (culot 1). Lors de la seconde précipitation, l’ensemble de la RuBisCO est précipitée. En effet, le SN2 (piste 4) ne présente pas de bande à la taille attendue, la RuBisCO se retrouve dans le culot 2 (piste 5). Néanmoins, cette précipitation n’est pas spécifique à la RuBisCO et une grande partie des autres protéines sont précipitées, dont éventuellement les XEGIPs du houblon.

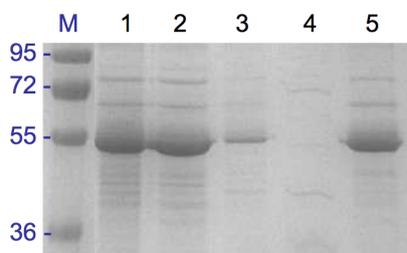


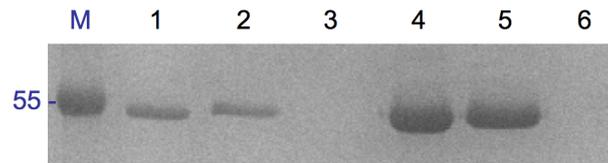
Figure 5.6 – SDS-PAGE des échantillons protéiques de houblon lors du fractionnement par l’utilisation du PEG. M : marqueur de taille. 1 : SN0. 2 : SN1. 3 : culot 1. 4 : SN2. 5 : culot 2.

5.3.3.3 Utilisation du couple acide phytique et chlorure de calcium

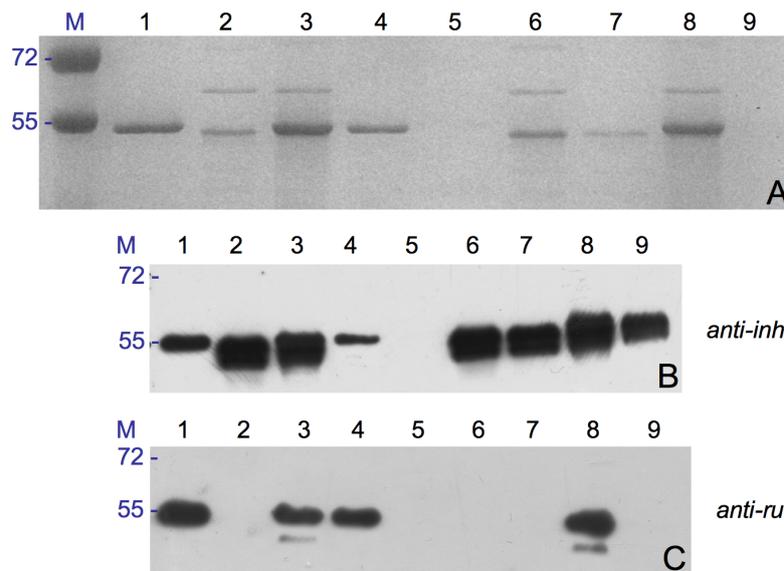
A partir du protocole décrit par Krishnan et collaborateurs [Krishnan and Natarajan, 2009], le ratio acide phytique/chlorure de calcium a été optimisé et la suppression de la RuBisCO confirmée à un ratio de 1 : 10, pour une concentration fixe en acide phytique de 4 mM. On constate ainsi à la figure 5.7a (page 143) que dans les pistes (3 et 6), où les réactions ont été effectuées avec un ratio de 1 : 10, la RuBisCO a disparu. Elle reste présente au ratio 1 : 5 (pistes 2 et 5).

L'élimination de la RuBisCO est utilisable dans notre contexte, si et seulement si, elle n'occasionne pas la précipitation de nos protéines d'intérêt. Ne disposant pas des protéines natives, les protéines recombinantes (issues d'un éluat de purification en HisTrap de inhibiteur n° 1 dans la souche Arctic) ont été mises en solution avec un extrait protéique de feuilles de houblon, puis soumises au protocole de suppression de la RuBisCO. La détection de la RuBisCO a été rendue possible par l'utilisation d'un anticorps primaire anti-RuBisCO. Ainsi la figure 5.7b (page 143) présente les résultats obtenus sur SDS-PAGE (image A) et en western blots avec des anticorps anti-inhibiteur et anti-rubisco (images B et C). Les échantillons présentant l'inhibiteur ou l'extrait protéique de houblon ont été testés séparément (pistes 1 et 2, puis les pistes 4 à 7 après l'action de l'acide phytique et du CaCl_2). Les bandes correspondant à la RuBisCO ou à l'inhibiteur sont visibles en SDS-PAGE. Après l'action de l'acide phytique et du CaCl_2 , la RuBisCO est précipitée (piste 5), donnée confirmée par l'absence de signal en western blots. L'inhibiteur est toujours présent (piste 7), avec un signal en western blot anti-inhibiteur. L'absence de bande pour l'échantillon inhibiteur en western blot anti-rubisco permet de valider la spécificité de cet anticorps primaire. En mélange, les protéines de houblon et l'inhibiteur se comportent de manière similaire. Ainsi, bien qu'aucune bande ne soit observable en SDS-PAGE (piste 9), un signal apparaît en western blot anti-inhibiteur, mais est absent en western blot anti-rubisco. Cela permet de confirmer la possibilité de précipiter la RuBisCO tout en préservant une partie des inhibiteurs.

Des échantillons protéiques (notamment après contamination fongique) sans RuBisCO ont été analysés par western blot. Aucun inhibiteur de houblon n'a pu être mis en évidence. On peut supposer que la production des XEGIPs dans le houblon est trop faible pour être visualisée par cette technique d'immunodétection associée aux traitements de suppression de la RuBisCO.



(a) Analyse en SDS-PAGE de 5 μg et de 17,5 μg de protéines de houblon mis en contact avec un ratio CaCl_2 / acide phytique (4 mM) de 1 : 5. M : marqueur de taille. 1 à 3 : 5 μg de protéines seules, avec un ratio 1 : 5 ou 1 : 10. 4 à 6 : 17,5 μg de protéines seules, avec un ratio 1 : 5 ou 1 : 10.



(b) Effet de la suppression de la RuBisCO par l'utilisation du couple acide phytique et chlorure de calcium sur les protéines recombinantes. A : SDS-PAGE. B : western blot anti-inhibiteur. C : western blot anti-rubisco. 1 : Protéines de houblon (8 μg). 2 : Inhibiteur (17 μg). 3 : Mélange protéines de houblon et inhibiteur. Les puits de 4 à 9 présentent ces échantillons soumis au ratio acide phytique/chlorure de calcium respectif 1 : 5 et 1 : 10, pour le houblon seul (4 et 5), pour l'éluat seul (6 et 7) et pour le mélange houblon et éluat (8 et 9).

Figure 5.7 – Résultats obtenus lors des travaux de suppression de la RuBisCO par l'utilisation du couple acide phytique / chlorure de calcium.

5.3.4 Mise en place de la PCR quantitative

5.3.4.1 Spécificité des amorces

Les amorces choisies ont dû répondre à un cahier des charges précis :

- une spécificité amorces /gènes, c'est-à-dire que l'amorce pour l'inhibiteur n° 1 ne doit pas s'hybrider sur le gène de l'inhibiteur n° 2 et vice versa ;
- les produits de PCR obtenus doivent être de taille proche, afin que la vitesse d'amplification n'influence pas les données résultant de l'expression des gènes ;
- les amorces ne doivent pas s'hybrider sur les génomes des champignons testés lors des tests de stress biotiques.

L'utilisation des amorces a nécessité des contrôles et des optimisations effectués dans un premier temps par PCR (à partir d'ADN plasmidique), puis par RT-PCR à partir d'ADNc de plante. Enfin les PCRs ont été effectuées sur l'appareil StepOnePlus™ utilisé pour les tests d'expression.

Chaque ADN plasmidique des inhibiteurs a été amplifié par PCR avec les différents jeux d'amorces. Il s'agit de déterminer si les amorces sont spécifiques à leur inhibiteur cible. La figure 5.8 (page 144) présente les produits de PCR obtenus avec une température d'annealing de 59 °C, pour un des jeux d'amorces décrit dans le tableau 5.1 (page 135). On constate que pour chaque jeu d'amorces (piste 1 à 3 pour l'inhibiteur n° 1, piste 4 à 6 pour l'inhibiteur n° 2, piste 7 à 9 pour l'inhibiteur n° 3) un seul signal apparaît. Celui-ci est spécifique au couple ADN de l'inhibiteur α / jeu d'amorces défini pour l'inhibiteur α , avec une taille d'amplicon équivalente. Ces amorces semblent répondre au cahier des charges décrit précédemment.

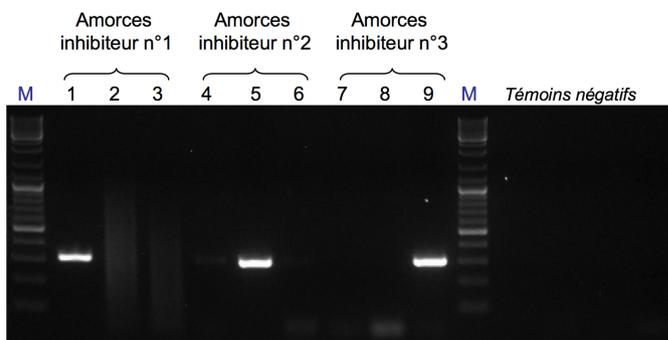


Figure 5.8 – PCR réalisée à partir d'ADN plasmidique des inhibiteurs et les amorces utilisées lors de la quantification en PCR. 1 à 3 : amorces spécifiques à l'inhibiteur n° 1. 4 à 6 : amorces spécifiques à l'inhibiteur n° 2. 7 à 9 : amorces spécifiques à l'inhibiteur n° 3. 1, 4 et 7 : ADN plasmidique de l'inhibiteur n° 1. 2, 5 et 8 : ADN plasmidique de l'inhibiteur n° 2. 3, 6 et 9 : ADN plasmidique de l'inhibiteur n° 3.

Ces amorces ont ensuite été testées sur de l'ADNc de plantes, afin d'une part de vérifier le comportement de ces oligos sur un matériel génétique végétal et de valider leur spécificité. Par PCR quantitative, le choix de ces amorces a été validé et l'ajustement des conditions de PCR (température d'annealing, nombre de cycles) effectué. La figure 5.9 (page 145) nous montre un signal spécifique pour chaque jeu d'amorces sur l'ADNc de houblon (pistes de 1 à 4). Les produits de PCR obtenus ont été séquencés puis comparés aux séquences nucléotiques des inhibiteurs. Ces séquences se sont montrées identiques à celles attendues.

L'absence d'amplification sur l'ADNc de *F. graminearum* a été validée par PCR quantitative comme constaté sur la figure 5.9 (page 145) avec l'absence de signal sur les pistes 5 à 8.

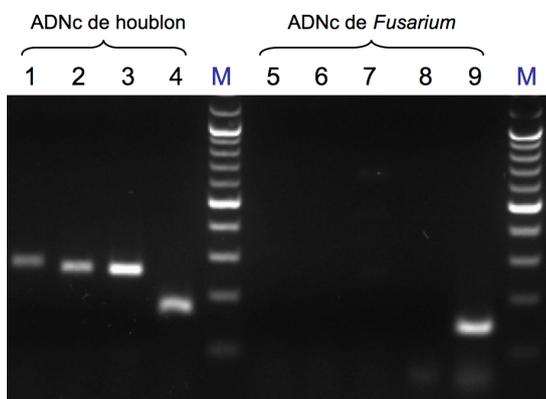
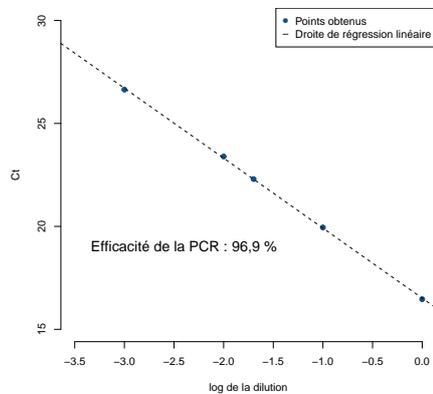


Figure 5.9 – Produits de PCR quantitative obtenus à partir d'ADNc de houblon et de *F. graminearum*. Les PCRs sont réalisées à partir des d'amorces de l'inhibiteur n° 1 (piste 1 et 5), de l'inhibiteur n° 2 (piste 2 et 6), de l'inhibiteur n° 3 (piste 3 et 7), de la GAPDH (piste 4 et 8) et la β -tubuline comme contrôle positif (piste 9). La température d'annealing est fixée à 58 °C pour un nombre de cycle de 32.

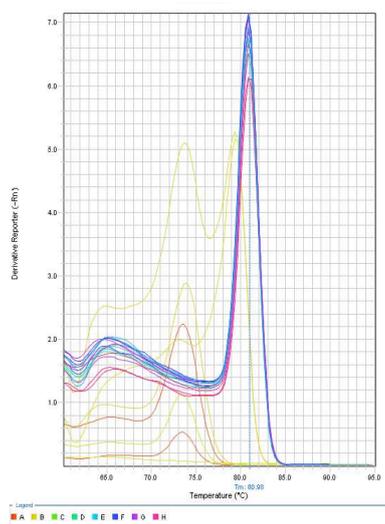
5.3.4.2 Analyse des données

L'ensemble des données collectées par l'analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative est analysé selon les points suivants :

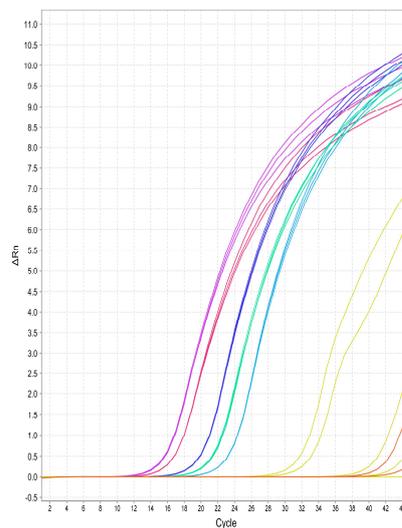
- l'efficacité de PCR. Celle-ci peut être représentée par le tracé du logarithme des dilutions (ou des concentrations) de l'ADNc en fonction du Ct. L'efficacité, définie en pourcentage, doit être proche de 100 %. La figure 5.10a (page 146) montre l'efficacité de PCR pour le gène de la GAPDH, lors des tests d'expression des inhibiteurs en cours de germination.
- l'analyse des courbes de fusion. Cette analyse permet de visualiser d'éventuelles contaminations d'ADNg, les amplifications non spécifiques ou la formation de dimères, en comparant les T_m (*melting temperature*) obtenues après la PCR quantitative. La figure 5.10c (page 146) montre ainsi un pic identique pour les ADNc des échantillons à analyser (tracé de D à H) et des T_m différents pour les contrôles négatifs (tracé de A à C).
- l'analyse des courbes d'amplification. L'analyse de ces courbes a pour but de visualiser la reproductibilité des réplicats techniques et également de choisir la bonne position du seuil du cycle. La figure 5.10b (page 146) montre ainsi une bonne reproductibilité des réplicats techniques. Les contrôles négatifs sortent plus tardivement (Ct à partir de 28), signe d'une aspécificité de ces amplifications.



(a) Courbe d'efficacité.



(b) Courbe de fusion.



(c) Courbe d'amplification.

Figure 5.10 – Traitement des données de PCR quantitative. Les figures 5.10c et 5.10b sont issues du logiciel du StepOne Plus lors des tests d'expressions des inhibiteurs sur des graines en cours de germination. Les données visualisées correspondent au gène codant pour la GAPDH.

A : contrôle négatif, tampon de synthèse d'ADNc. B : contrôle négatif, tampon du mix PCR.

C : contrôle négatif, ARN. D : ADNc de graines sèches. E : ADNc de graines imbibées. F : ADNc de graines au stade J2. G : ADNc au stade radicelle. H : ADNc au stade cotylédons.

5.3.5 Expression des inhibiteurs

Ce projet s'est intéressé à l'expression des inhibiteurs selon plusieurs critères :

- les variétés. Un des critères de sélection d'une variété de houblon est sa capacité à résister aux pathogènes. Cette étude pourrait apporter un éclaircissement sur les liens éventuels entre induction des inhibiteurs et réponse de la plante face à un pathogène.
- lors de la germination. La germination d'une graine est une étape importante dans la

vie de la future plante et la distribution temporelle des inhibiteurs pourrait être mise en corrélation avec la fonction de ces protéines.

- selon la distribution spatiale. Tous les tissus (tige, racine, feuille, cône femelle) ne sont pas exposés aux stress identiquement. On peut se poser la question s’il existe un organe présentant une surexpression d’un ou de plusieurs inhibiteur(s).
- face à un stress abiotique et biotique. Il s’agit de savoir si la plante met en place une expression différentielle des inhibiteurs face à ces stress.

5.3.5.1 Etude de l’expression relative des inhibiteurs selon les variétés

Plusieurs variétés ont été analysées et la variété Strisselspalt a été choisie comme variété de référence du fait de sa forte représentation dans les houblonnières alsaciennes. Les résultats sont présentés en figure 5.11 (page 147). Pour chaque inhibiteur, on observe des différences significatives entre les variétés, à l’exception des variétés Fuggle, Savinjski Golding et Sélection variétale pour lesquelles l’inhibiteur n°1 est exprimé à des valeurs identiques. La variété sauvage présente l’expression des inhibiteurs la plus élevée, avec une expression $5,1 \pm 0,4$ fois, $3,1 \pm 0,1$ fois ou $17,8 \pm 3,2$ fois plus importante respectivement pour les inhibiteurs n°1, n°2 et n°3 en comparaison avec la variété Strisselspalt. Il est généralement admis que les souches sauvages présentent des caractères de résistance plus importants que les souches cultivées. C’est la raison pour laquelle de nombreux programmes de sélections variétales utilisent une souche sauvage afin de conférer aux nouveaux croisements une meilleure résistance aux pathogènes [Prohens et al., 2003, Le Roux et al., 2008].

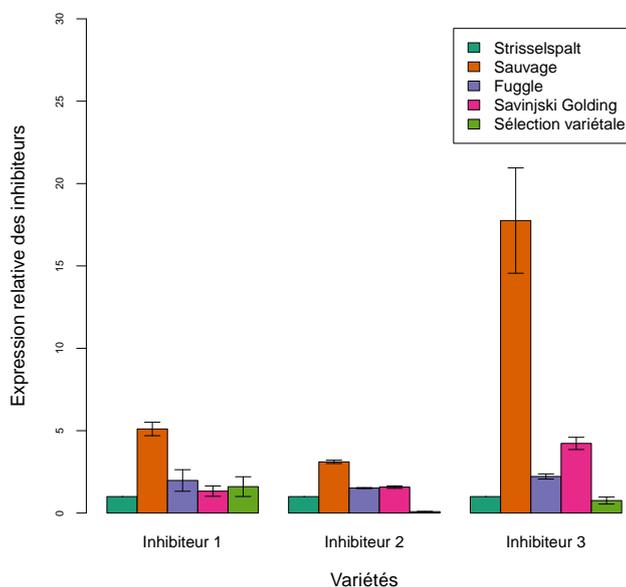


Figure 5.11 – Expression relative des inhibiteurs chez plusieurs variétés. L’expression relative d’un inhibiteur est normalisée par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenus pour la variété Strisselspalt. Un plant par variété a été utilisé pour cette analyse.

L'utilisation du gène de l'inhibiteur n° 1 de la variété Strisselspalt comme gène de contrôle permet de visualiser la proportion des inhibiteurs par rapport à ce gène (Figure 5.12, page 148). Il apparaît ainsi que pour toutes les variétés analysées, l'inhibiteur n° 2 est sur-exprimé jusqu'à 5 000 fois plus que les autres inhibiteurs.

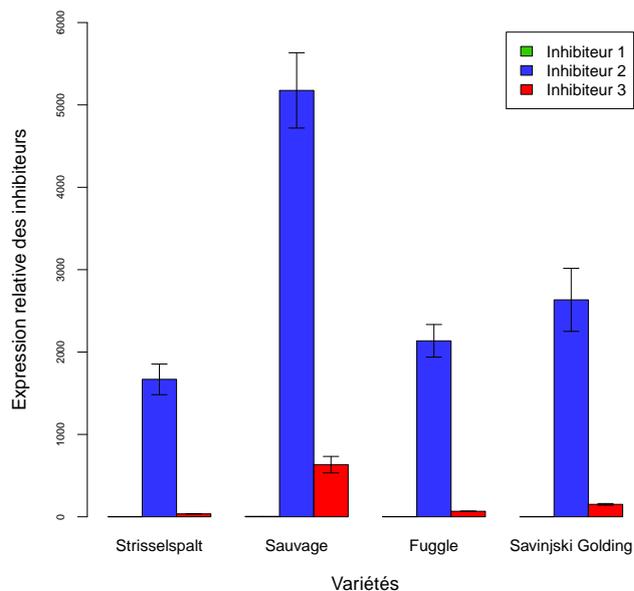


Figure 5.12 – Expression relative des inhibiteurs chez plusieurs variétés. L'expression relative est normalisée pour l'ensemble des inhibiteurs par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour l'inhibiteur n° 1 de la variété Strisselspalt. Un plant par variété a été utilisé pour cet analyse.

5.3.5.2 Etude de l'expression relative des inhibiteurs lors de la germination

Afin de connaître l'expression des inhibiteurs au cours de la germination, des graines ont été prélevées à différents temps et analysées en PCR quantitative en normalisant par rapport à l'expression chez la graine sèche. La figure 5.13 (page 149) présente les résultats obtenus. Les analyses statistiques nous permettent d'observer une différence significative entre les différents stades des inhibiteurs, à l'exception du stade J2 et cotylédons pour l'inhibiteur n° 1 qui présente des valeurs identiques en terme d'expression. On constate que l'inhibiteur n° 2 n'est pas surexprimé au cours de la germination. L'inhibiteur n° 1 augmente progressivement jusqu'au stade radicule pour revenir à une expression identique qu'au stade J2. L'inhibiteur n° 3 montre une expression croissante au cours de la germination avec des valeurs importantes au stade radicule et au stade cotylédons respectivement de $41,2 \pm 3,2$ et de $71,4 \pm 2,7$ fois plus importante que l'expression de l'inhibiteur n° 3 sur graines. De tous les inhibiteurs, l'inhibiteur n° 3 se caractérise par une surexpression plus importante lors de la germination.

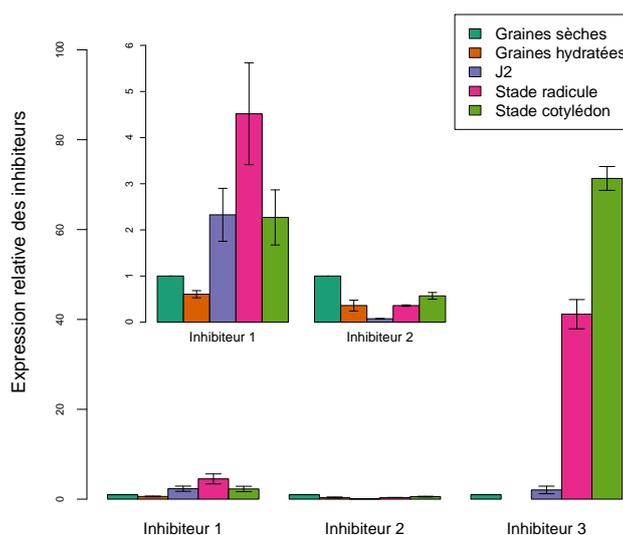


Figure 5.13 – Expression relative des inhibiteurs au cours de la germination. L'expression relative d'un inhibiteur est normalisée par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour la graine sèche. Pour un même stade de développement, l'analyse a nécessité plusieurs graines (20 graines aux stades « graines », 12 graines aux stades « radicule » et « cotylédons »). Du fait d'une expression plus importante de l'inhibiteur n° 3, un encadré présentant les résultats de l'inhibiteur n° 1 et de l'inhibiteur n° 2 est ajouté dans la figure.

La comparaison par rapport à l'expression du gène de l'inhibiteur n° 1 dans la graine sèche (Figure 5.14, page 150), nous montre une expression beaucoup plus importante de l'inhibiteur n° 2 lors des premiers stades. Ce dernier, fortement exprimé dans la graine sèche ou hydratée, diminue au second jour pour augmenter ensuite progressivement lors du stade radicule et cotylédons. Il reste néanmoins en proportion plus faible que l'inhibiteur n° 3, exprimé qui présente lui aussi une surexpression progressive lors de ces deux derniers stades. Globalement, on peut remarquer que lors du second jour, les trois inhibiteurs présentent une faible surexpression. La surexpression de l'inhibiteur n° 1 est faible comparée à celle des deux autres inhibiteurs.

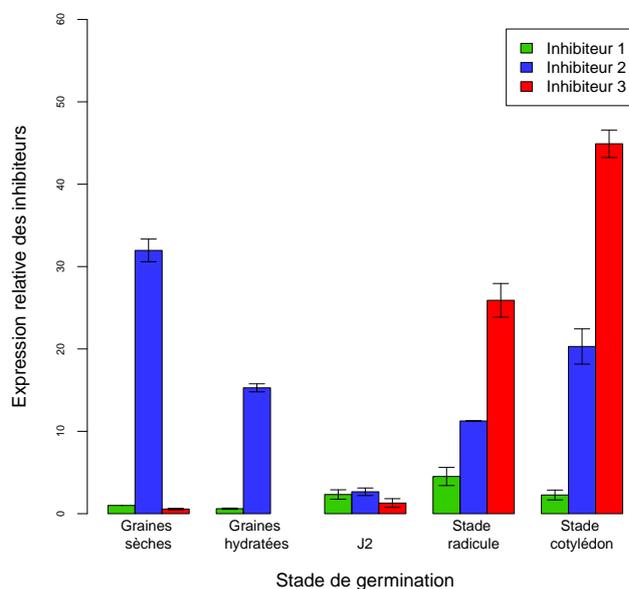


Figure 5.14 – Expression relative des inhibiteurs au cours de la germination. L'expression relative est normalisée pour l'ensemble des inhibiteurs par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour la graine sèche pour l'inhibiteur n° 1. Pour un même stade de développement, l'analyse a nécessité plusieurs graines (20 graines aux stades « graines », 12 graines aux stades « radicule » et « cotylédons »).

5.3.5.3 Etude de l'expression spatiale relative des inhibiteurs

La figure 5.15 (page 151) présente l'expression relative des inhibiteurs dans les différents tissus. L'inhibiteur n°3 présente la surexpression la plus importante, et ce dans les racines et dans les cônes avec respectivement une expression $10,5 \pm 1,8$ fois et $31,7 \pm 3,0$ fois plus que dans la graine. L'expression de l'inhibiteur n°1 est plus forte dans la graine que dans les autres tissus. L'expression de l'inhibiteur n°2 dans les cônes est identique à celle dans la graine. Dans la tige, elle est deux fois plus importante.

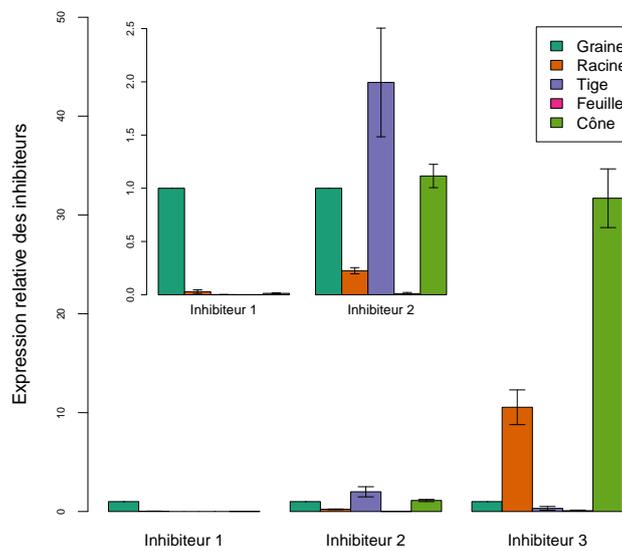


Figure 5.15 – Distribution des inhibiteurs dans différents tissus de la plante : graine, racine, tige, feuille et cône femelle. L'expression relative d'un inhibiteur est normalisée par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour la graine. Du fait d'une expression plus importante de l'inhibiteur n°3, un encadré présentant les résultats de l'inhibiteur n°1 et de l'inhibiteur n°2 est ajouté dans la figure.

En normalisant par rapport à l'expression de l'inhibiteur n° 1 dans la graine, on constate (Figure 5.16, page 152) que l'inhibiteur n° 2 est l'inhibiteur le plus exprimé par rapport aux deux autres inhibiteurs. L'inhibiteur n° 2 et l'inhibiteur n° 3 ont une expression relative identique dans la racine. L'expression relative dans la tige est $89,7 \pm 13,5$ fois plus importante que celle de l'inhibiteur n° 1. L'expression dans la feuille est très faible quelque soit la protéine. Enfin, dans les cônes, l'inhibiteur n° 2 est environ deux fois plus exprimé que l'inhibiteur n° 3. Globalement, l'expression des inhibiteurs est différente tant selon les organes que selon les inhibiteurs.

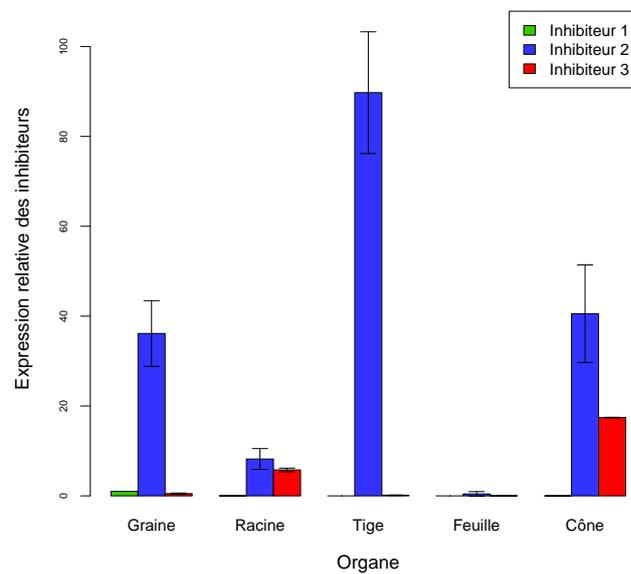


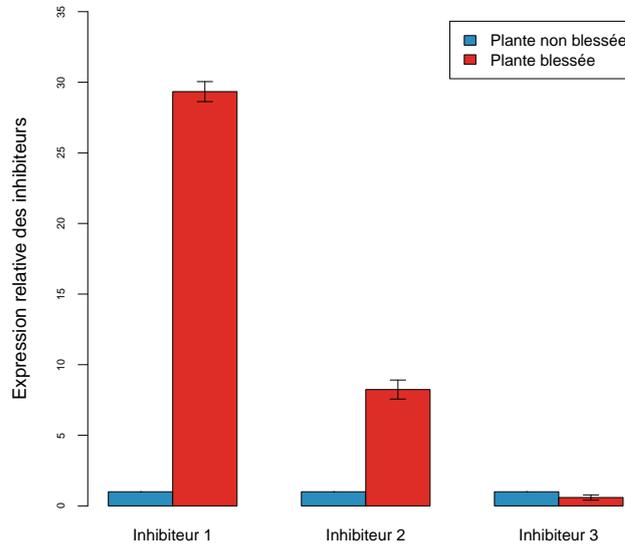
Figure 5.16 – Distribution des inhibiteurs dans différents tissus de la plante : graine, racine, tige, feuille et cône femelle. L'expression relative est normalisée pour l'ensemble des inhibiteurs par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour la graine pour l'inhibiteur n° 1.

5.3.5.4 Etude de l'expression relative des inhibiteurs face à un stress abiotique et biotique

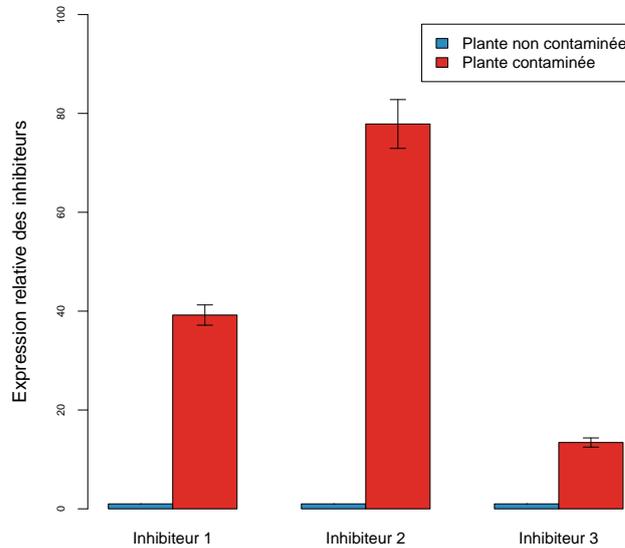
Les plants utilisés lors de ces études ont deux origines :

- des plants mâles issus de la sélection variétale 2010 et cultivés en godet de terre. Ils peuvent présenter des différences intragénétiques, les croisements ayant justement ce but : permettre l'obtention de caractères phénotypiques différents tant dans leur aptitude à répondre aux stress abiotiques et biotiques que dans leur teneur en acide- α .
- des plants issus de la culture de tissus. Ces plants ont un patrimoine génétique identique, sont stériles et de même âge. Leur utilisation permet de s'affranchir des différences intergénétiques pouvant exister entre plusieurs plants. De plus, cette technique permet d'obtenir un grand nombre de plants, permettant ainsi de définir des expériences avec des réplicats biologiques.

Les plants de houblon ont été exposés à des stress dits abiotiques, c'est-à-dire des blessures, ou des stress biotiques, comme l'inoculation de champignon (*F. graminearum*, par mycélium ou spores). Des essais préliminaires ont tout d'abord été réalisés sur trois jours, sur des plants Sélection variétale. Les blessures ou l'inoculation de champignon (par dépôt mycélien sur la plante) entraînent une induction des gènes des inhibiteurs chez la plante (Figure 5.17, page 154). L'inhibiteur n° 1 est près de 30 fois surexprimé sur le plant blessé par rapport au témoin. L'inhibiteur n° 2 présente une expression plus faible que l'inhibiteur n° 1 mais statistiquement plus forte que le témoin ($8,2 \pm 0,7$). L'inhibiteur n° 3 n'est pas exprimé et son expression est statistiquement identique au témoin. En contact avec un pathogène, la tendance est inversée par rapport au stress abiotique. En effet, l'inhibiteur n° 2 présente la expression la plus importante ($77,8 \pm 4,9$) par rapport au témoin. L'inhibiteur n° 1 et l'inhibiteur n° 3 ont quant à eux une expression respectivement de $39,2 \pm 2,0$ et $13,4 \pm 0,9$ par rapport au plant sain.



(a) Expression des inhibiteurs face à un stress abiotique.



(b) Expression des inhibiteurs face à un stress biotique.

Figure 5.17 – Expression relative des gènes codant les inhibiteurs 72 h après blessures et inoculation de champignon d'un plant de houblon Sélection variétale. L'expression relative d'un inhibiteur est normalisée par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour le plant témoin.

Ces premiers résultats montrent l'induction des gènes correspondant aux inhibiteurs après 72 h de traitements abiotiques ou biotiques. Afin de confirmer ces résultats et de caractériser plus finement l'expression de ces gènes, de nouvelles expériences ont été réalisées avec des prélèvements réguliers après blessures ou inoculation de spores de *F. graminearum* (permettant une homogénéité et reproductivité de l'inoculation). Ces expérimentations ont été effectuées à la fois sur des plants de houblon Sélection variétale et des plants issus de la culture de tissus (variété Fuggle).

La figure 5.18 (page 155) présente les résultats obtenus dans le cas de blessures sur les plants Sélection variétale. L'inhibiteur n° 1 montre une surexpression avec un maximum atteint à 72 h. L'inhibiteur n° 2 présente une surexpression plus faible mais statistiquement différente de l'expression du témoin. Les valeurs pour l'inhibiteur n° 3 ne sont pas statistiquement différentes. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec les premiers essais (Figure 5.17a, page 154), à savoir une expression plus importante pour l'inhibiteur n° 1 et une absence d'induction pour l'inhibiteur n° 3.

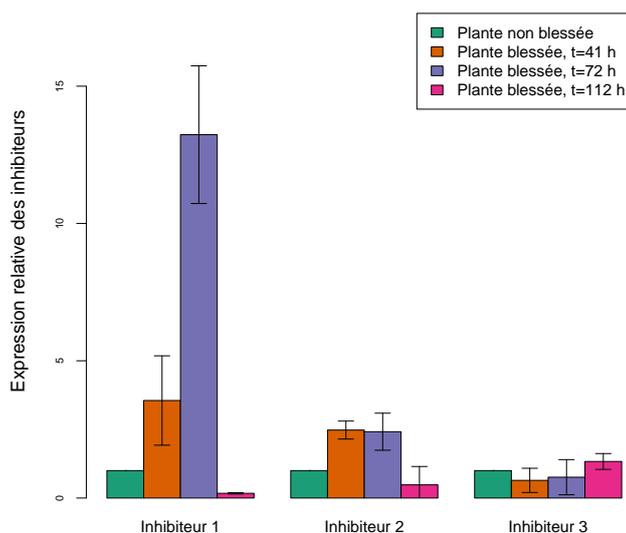


Figure 5.18 – Expression relative des gènes codant les inhibiteurs après blessure de plants de houblon Sélection variétale. L'expression relative d'un inhibiteur est normalisée par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour le plant non blessé. Par condition, un plant issu de la sélection variétale a été utilisé pour cette analyse.

Après inoculation des spores de *F. graminearum*, le plant contaminé Sélection variétale a été prélevé à 6 jours d'infection et présentait sur l'ensemble du pied un dépérissement global de plante caractérisé par un dessèchement de la partie aérienne. On constate, à la figure 5.19 (page 156), une surexpression importante de l'inhibiteur n° 2, avec une induction plus de 500 fois ($550,5 \pm 59,6$) supérieure à celle du plant témoin. L'inhibiteur n° 1 et l'inhibiteur n° 3 présentent respectivement une surexpression de $6,4 \pm 2,1$ et de $12,4 \pm 4,9$ en comparaison au plant sain.

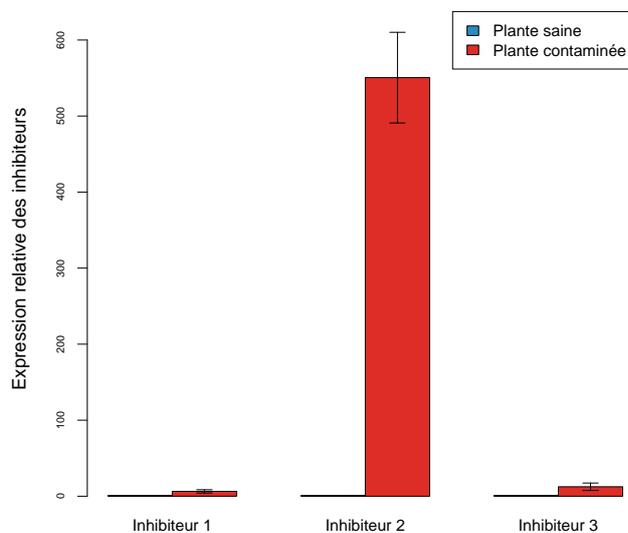


Figure 5.19 – Expression relative des gènes codant les inhibiteurs après inoculation de spores sur un plant issu de la sélection variétale. L'expression relative d'un inhibiteur est normalisée par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour le plant non contaminé.

L'influence du stress biotique a été testée sur des plants de variété Fuggle. Des plants issus de culture de tissus ont été inoculés par suspension de spores de *F. graminearum* (1.10^5 spores) et les prélèvements ont été effectués selon leur état pathologique. Trois stades sont décrits :

Stade A : début d'infection avec la présence de mycélium sur les feuilles sèches ;

Stade B : propagation du champignon sur la moitié de la plante ;

Stade C : présence du champignon sur l'ensemble de la plante et début de nécrose.

On constate que l'inhibiteur n° 1 n'est pas induit lors de cette contamination (Figure 5.20, page 157). L'inhibiteur n° 2 voit son expression augmenter progressivement au cours de la propagation du champignon. Au stade A et B, l'expression est statistiquement identique et supérieure au plant sain ($2,7 \pm 0,2$). Au stade C, l'expression est de $8,5 \pm 0,5$. Enfin l'inhibiteur n° 3 est légèrement induit lors de ce stress biotique. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en figure 5.17b (page 154), même si les taux sont différents.

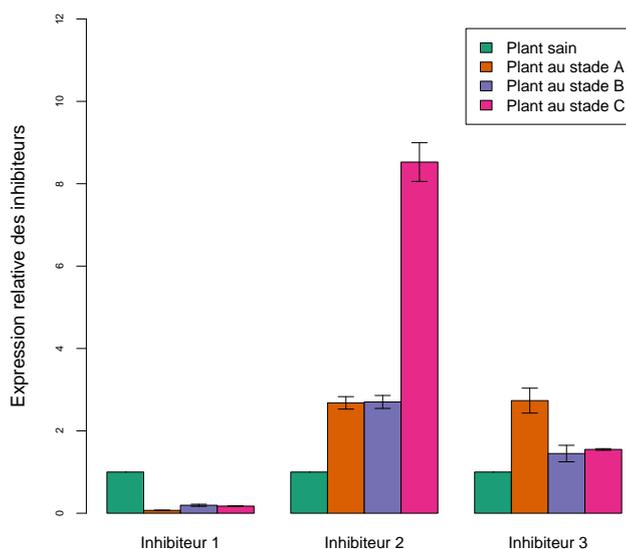


Figure 5.20 – Expression relative des gènes codant les inhibiteurs après inoculation de spores sur la variété Fuggle. L'expression relative d'un inhibiteur est normalisée par la moyenne des triplicats des $2^{-\Delta\Delta ct}$ obtenus pour le plant non contaminé. Par condition, un plant Fuggle a été utilisé pour cette analyse.

5.4 Discussion

Les résultats décrits dans la partie précédente montrent l'expression des inhibiteurs selon plusieurs conditions. Peu d'études font référence à l'analyse de l'expression des inhibiteurs de xylanase ou de xyloglucanase par PCR quantitative. Seule une étude sur la conglutine- γ [Scarafoni et al., 2010] analyse l'induction de cette XEGIP supposée selon cette technique. D'autres études utilisent la technique du northern blot. Les travaux basés sur des analyses protéiques par des mesures d'activités enzymatiques, des quantifications par immunologie ou des profils protéiques bidimensionnels sont plus développés. Ainsi, plusieurs études sur les inhibiteurs de xylanases comparent les différences pouvant exister entre plusieurs variétés de blé [Gebruers et al., 2002, Bonnin et al., 2005, Croes et al., 2009a, Croes et al., 2009b]. Ces études ont pu montrer de nombreuses différences intervariétales quantitativement (différence entre la proportion des inhibiteurs) et qualitativement (en terme d'inhibition des xylanases), avec par exemple un facteur 5 en quantité protéique d'isoformes d'inhibiteurs de xylanases [Croes et al., 2009a]. Dans le cas des inhibiteurs de houblon, à l'exception de la souche sauvage, les différentes variétés ont une expression des inhibiteurs proches les unes des autres.

5.4.1 Distribution spatiale et temporelle des inhibiteurs

Les résultats de PCR quantitative nous ont montré des différences d'expression des inhibiteurs. Au cours de la germination, l'inhibiteur n° 3 présente une expression beaucoup plus importante lors des stades radicule et cotylédons. La germination et le passage à un organisme indépendant sont des phases critiques dans la vie de la plante du fait de leur forte vulnérabilité aux blessures, aux maladies ou au stress hydrique [Raven et al., 2005]. Durant le processus de germination, il a été montré chez plusieurs plantes que des gènes connus pour être induits lors de stress étaient surexprimés. Ainsi près de 10 % des protéines identifiées chez le riz en cours de la germination peuvent se classer dans le groupe des protéines de stress voire de défense [Kim et al., 2009]. Les gènes codant pour ces protéines se retrouvent également surexprimés chez le maïs [Revilla et al., 2009]. Dans le cadre d'une étude protéomique sur le développement de l'embryon de riz, l'induction de protéines *heat shock* et d'autres protéines de stress a été corrélée avec l'éventualité que ces protéines pouvaient empêcher les dommages résultant des stress environnementaux auxquels la plante peut être confrontée au cours de la germination. La seconde hypothèse établie est que ces protéines puissent faire partie d'un mécanisme de défense qui serait activé durant la germination [Kim et al., 2009]. Il a été montré que les inhibiteurs de type TAXI, XIP et TLXI présentaient une quantité protéique accrue en début de germination puis diminuaient après le 23^e jour [Croes et al., 2009c]. Des travaux ont été effectués sur la cuticule de la tomate afin de déterminer les protéines impliquées dans sa synthèse [Yeats et al., 2010]. Après identification de certaines protéines, une confirmation des données par PCR quantitative a été réalisée. Parmi les gènes étudiés se trouve celui de la XEGIP [Qin et al., 2003]. L'expression de ce gène s'est révélée plus importante dans l'épiderme que dans le péricarpe. De plus, lors de la maturation du fruit, il a été montré que l'expression de la XEGIP, ainsi que d'une PR-protéine (PR-1, SGN-U579545), présentait deux pics d'expression : un premier lors des premiers stades de la maturation et un second en fin de croissance. Ces résultats sont d'ailleurs cohérents avec ceux obtenus par Qin et collaborateurs lors d'analyses en northern blot [Qin et al., 2003]. Le taux d'ARNm d'EDGP est faible dans les graines sèches mais augmentent rapidement dans les graines en cours de germination [Sato et al., 1992]. Les résultats montrent que les inhibiteurs n° 1 et n° 3 du houblon se comportent globalement de la même façon.

Tout comme lors de la germination, l'inhibiteur n°3 présente la plus forte variation d'expression selon les stades physiologiques avec une expression importante dans les cônes et dans des proportions moindres dans les racines. Ces différences spatiales se retrouvent également chez les inhibiteurs de xylanases dans le grain de blé qui montre des proportions différentes selon les enveloppes de caryopses (une grande concentration est retrouvée dans la couche à aleurone) [Croes et al., 2009b]. Ces inhibiteurs se retrouvent également dans les autres parties de la plante. Leur présence a été validée notamment par la réalisation de test enzymatique d'inhibition, montrant ainsi leur occurrence dans les racines, les tiges, les feuilles et les grains en cours de germination et germés [Goesaert et al., 2004]. Les quantités d'inhibiteurs les plus importantes se retrouvent lors du développement du grain et les plus basses dans les échantillons racinaires âgés. Des études en northern blot ont montré des quantités importantes de transcripts correspondant aux inhibiteurs de type TAXI-I et XIP-I aux différents stades de germination avec les quantités les plus importantes au niveau des racines [Igawa et al., 2005]. Les inhibiteurs de type TLXI n'ont pas pu être identifiés dans d'autres tissus de la plante que ceux du grain de blé [Croes et al., 2009c]. De plus, les études par immunologie n'ont pas permis de les détecter dans les feuilles, les tiges et les racines des plants adultes les inhibiteurs de xylanases [Croes et al., 2009c]. L'ensemble de ces résultats trouvés chez les inhibiteurs de xylanases est cohérent avec ceux obtenus pour les inhibiteurs de houblon. Les analyses en northern blot montrent que la XEGIP de la tomate se retrouve dans tous les tissus de la plante, avec une plus faible expression dans les feuilles [Qin et al., 2003]. L'expression de l'EDGP montre un signal important (par l'analyse de l'ARNm du gène correspondant) dans les racines et dans les cals non-embryogéniques. NEC4, une des cinq protéines du protéome du nectar du tabac ornemental, présente une expression uniquement dans les tissus nectarifères et notamment une expression particulièrement importante 48 h après pollinisation [Naqvi et al., 2005]. On peut remarquer ainsi l'expression importante de l'inhibiteur n°3 dans les cônes de houblon. Les fleurs femelles sont construites par des bractées sur un rachis. La production de nectar est quasiment inexistante puisque la fleur femelle de houblon produit essentiellement des résines, notamment par les glandes à lupuline. Néanmoins la fleur abrite les graines, structure de survie de la plante assurant la pérennité de l'espèce tout en permettant le brassage génétique. On peut supposer que cette induction permet un bon développement des graines, sans attaque avant dissémination.

5.4.2 Stress abiotique et stress biotique

Deux types de plants ont été utilisés lors de ces analyses, à savoir des plants issus de culture de tissus et des plants de la sélection variétale. Les résultats obtenus sont cohérents et permettent de donner une tendance générale des expressions relatives des inhibiteurs face aux stress abiotiques et biotiques. Les résultats obtenus montrent des différences d'expression des inhibiteurs selon le stress. Ainsi les blessures induisent une expression importante de l'inhibiteur n°1. Une attaque fongique par *F. graminearum* induit plutôt une expression de l'inhibiteur n°2 et en plus faible proportion l'inhibiteur n°1. L'inhibiteur n°3 n'est pas ou peu surexprimé lors de ces stress.

Les inhibiteurs de xylanases montrent également des différences d'expression selon les pathogènes inoculés ou le site d'infection. Par exemple, *Xip-I* est induit par l'inoculation de *Blumeria graminis*, contrairement à *Xip-III* [Igawa et al., 2005]. L'induction de ces gènes est considérée comme pathogène-dépendante. *Taxi-Ia* est 8 fois moins induit que ces homologues *Taxi-Ib/III* et *Taxi-IIb/IV* [Igawa et al., 2004] lors d'une infection de *F. graminearum*. Les gènes *Taxi-Ia*, *Taxi-Ib/III*, *Taxi-IIb/IV* et *Xip-I* sont induits significativement lors de blessures sur feuilles de blé, mais non *Xip-III* [Igawa et al., 2004, Igawa et al., 2005]. L'induction

par des stress abiotiques et biotiques a également été observée chez des gènes codant pour des PGIps, montrant ainsi une régulation différentielle lors de blessures, de traitements avec des éliciteurs ou la présence de pathogènes [D'Ovidio et al., 2004b, Oliveira et al., 2010].

L'induction de protéines de défense par des stress biotiques et abiotiques est un fait communément observé chez les plantes. Les XEGIPs décrits dans plusieurs publications [Sato et al., 1992, Qin et al., 2003, Shang et al., 2004] sont d'ailleurs sécrétées dans le milieu de suspension de cultures cellulaires issues de cals. Ces derniers poussent normalement en réponse à une blessure [Qin et al., 2003] et plusieurs protéines de plantes exprimées lors de ces stress abiotiques sont détectées dans les cellules végétales cultivées en suspension [Sato et al., 1992]. Chez le cacao, un gène présentant des similarités avec l'EDGP de la carotte est régulé positivement lors de la réponse de défense de la plante [Verica et al., 2004]. D'autres homologues de l'EDGP sont induits lors d'infection : chez *Ageratum conyzoides* après infection d'*Agrobacterium tumefaciens* [Ditt et al., 2001] ou chez *A. thaliana* après infection de *Colletotrichum higginsianum* [Narusaka et al., 2004] et de *Pseudomonas syringae* [Bartsch et al., 2006]. De plus, le taux d'ARNm d'EDGP, faible dans la racine, augmente rapidement en réponse à une blessure [Sato et al., 1992]. La suppression de l'expression du gène de la XEGIP chez la tomate augmente la sensibilité à *P. infectans* avec une augmentation de la taille des lésions [Jones et al., 2006]. L'expression de la conglutine- γ a été testé en présence de chitosane, utilisé en tant qu'éliciteur des défenses naturelles de la plante [Scarafoni et al., 2010]. Dans ces conditions, les graines de lupin germées ont présenté une augmentation des ARNm codant la conglutine- γ (d'un facteur 2,5). Récemment et comme discuté en chapitre 4 (Section 4.4.5, page 126), il a été montré que l'interaction entre XEG et NEC4 déclenchait une cascade de réactions à l'origine d'un stress oxydatif [Harper et al., 2010]. De nombreux indices tendent à conforter l'idée que les XEGIPs jouent un rôle dans la défense de la plante.

L'expression de deux XEGIPs du tabac, NbXEGIP1 et NbXEGIP2, a été testée après inoculation par les champignons *Colletotrichum destructivum* et *C. orbiculare* [Xie et al., 2008]. NbXEGIP1 est induit durant les stades tardifs d'infection de deux champignons avec une surexpression à 96 h deux fois supérieure au témoin. Ce gène est également induit lors du développement de *P. syringae* pv. *tabaci*, pouvant suggérer de la capacité de cette protéine à inhiber les enzymes d'origine bactérienne. NbXEGIP2 est peu ou pas exprimé lors de l'infection de ces pathogènes. On retrouve ici les résultats observés pour les inhibiteurs de houblon, où l'inhibiteur n° 3 n'est faiblement voire non surexprimé en présence de *F. graminearum*. Les différences pouvant exister entre plusieurs homologues de XEGIPs ne sont donc pas spécifiques au houblon et une réponse spécifique à un stress peut être envisagée. On peut supposer un rôle distinct des inhibiteurs dans la défense de la plante. En outre, le chapitre 4 a montré que l'inhibiteur n° 3 recombinant n'avait pas la capacité à inhiber les enzymes présentant une capacité xyloglucan-spécifique endo- β -1,4-glucanases d'*A. aculeatus* et de *F. graminearum*. L'absence de surexpression face à *F. graminearum* pourrait ainsi se justifier. On peut alors s'interroger sur le rôle de cet inhibiteur qui est toutefois surexprimé à des taux importants lors de la germination (Figures 5.13 et 5.14, pages 149 et 150). Les XEGIPs pourraient jouer un rôle dans la croissance et le développement des plantes par la régulation des endo- β -1,4-glucanases endogènes. Outre une structure de ces enzymes (et notamment du mécanisme catalytique) éloignée des XEGs [Henrissat, 1991], des travaux *in vitro* sur une classe d'enzymes végétales, catalysant les liaisons xyloglucane (des xyloglucane endotransglucosylase-hydrolases), n'ont pas pu montrer la capacité inhibitrice de la XEGIP de la tomate sur ces enzymes [Qin et al., 2003]. Une autre possibilité serait que l'inhibiteur n° 3 ait la capacité d'inhiber des enzymes d'origine bactérienne. En effet, les inhibiteurs de xylanase se sont montrés pathogènes-dépendants [Igawa et al., 2005]. Le gène codant cette protéine serait alors induit face à une bactérie pathogène. Des tests enzymatiques d'inhibi-

tion seraient alors à effectuer sur plusieurs classes d'enzymes afin de déterminer si certaines d'entre elles peuvent être inhibées par l'inhibiteur n° 3. De la même manière, l'inhibiteur n° 2 est globalement plus surexprimé par rapport aux deux autres inhibiteurs (Figures 5.12 et 5.16, pages 148 et 152).

5.4.3 Rôle des inhibiteurs

Les tests d'inhibition réalisés (chapitre 4) ont montré des différences significatives entre les trois inhibiteurs recombinants. La forte capacité de l'inhibiteur n° 2 à réduire l'activité des enzymes testées fait de cet inhibiteur un candidat idéal pour la recherche d'enzymes cibles, notamment par co-immunoprécipitation. Les champignons prélevés et identifiés lors des études de dépérissement sur le houblon offrent la possibilité de cribler les enzymes de nombreux pathogènes, opportunistes ou saprophytes. Les études en PCR quantitative ont également montré un grand intérêt concernant l'inhibiteur n° 2, avec une surexpression relative importante lors des interactions plante / pathogène et une surexpression plus importante que l'inhibiteur n° 1 ou l'inhibiteur n° 3 dans de nombreuses conditions (dans les organes et les variétés testées). Une des stratégies viserait à poursuivre les études sur l'inhibiteur n° 2.

Il est important de souligner le rôle distinct des inhibiteurs. L'inhibiteur n° 3 présente une surexpression relative plus importante dans la variété sauvage que dans les autres. Son expression est régulée positivement lors de la germination de la graine ou dans les cônes femelles. Non induit par les stress abiotiques et biotiques testés, son rôle pourrait intervenir dans un rôle physiologique, plutôt que dans les mécanismes de défense de la plante. La recherche d'enzymes cibles pour l'inhibiteur n° 3 pourrait permettre d'expliquer son rôle et de comprendre les mécanismes dans lesquels cet inhibiteur intervient.

Les mécanismes dans lesquels les inhibiteurs de houblon interviennent dans la défense de la plante sont pour l'heure inconnus. Comme décrit précédemment chez le tabac ornemental, le complexe NEC4 / XEG interagit avec NEC5, une glucose oxydase, augmentant ainsi la production d' H_2O_2 et d'acide gluconique, deux composés connus pour leur implication dans les défenses de la plante [Harper et al., 2010]. Les recherches dans les bases génomiques de houblon n'ont pas permis de mettre en évidence l'existence de gène codant une glucose oxydase. On peut néanmoins envisager ce type de mécanisme avec la possibilité que les inhibiteurs, par la formation de complexes avec les enzymes, viennent activer les défenses de la plante.

La production des inhibiteurs, première ligne de défense, aurait ainsi deux rôles. Le premier serait le ralentissement de la prolifération du pathogène grâce à l'inactivation des CWDEs. Des études sur les inhibiteurs de xylanases ont par ailleurs montré l'activité antifongique de ces inhibiteurs suite à des interactions entre inhibiteurs et β -D-glucanes fongiques [Fierens et al., 2008]. Une étude sur une XIP du café a également mis en évidence la capacité de ces protéines à inhiber la germination de spores de la rouille asiatique du soja (*Phakopsora pachyrhizi*) [Vasconcelos et al., 2011]. Le second rôle serait celui d'initier les voies de signalisation qui contrôlent les défenses de la plante et d'activer les PR-protéines.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La découverte d'une EST du houblon présentant un domaine « *xylanase-inhibitor* » a été la pierre fondatrice de ce projet. Lors de l'attaque d'un pathogène, certaines protéines de l'arsenal enzymatique sécrété par le champignon peuvent être inhibées par des protéines de plantes. Ces inhibiteurs, dont font partie les inhibiteurs de xylanases, sont connus et bien documentés chez les céréales. Les inhibiteurs de type TAXI, XIP ou TLXI présentent des différences de mécanisme et de spécificité mais leur rôle dans la défense de la plante est établi. Les XEGIPs, protéines capables d'inhiber les xyloglucanases (endoglucanases clivant les liaisons β -1,4 du xyloglucane) de la famille des glycoside hydrolases 12 (GH12), sont par contre peu étudiées. La présence possible de protéines de ce type chez le houblon a ouvert la voie pour la compréhension du rôle et des mécanismes des inhibiteurs dans la défense chez cette plante. Ce projet a mis en lumière trois inhibiteurs chez le houblon avec une caractérisation tant enzymatique que transcriptomique.

Les RACEs effectuées sur le houblon à partir de cette EST ont mis en évidence non pas un gène mais trois gènes présentant une identité nucléotidique de 73 % (Chapitre 2). Ces gènes codent pour trois protéines d'environ 47 kDa avec un pourcentage de similarité de près de 80 %. La comparaison de ces séquences avec les bases de données du NIH indique des homologies avec des XEGIPs connus et caractérisés : NEC4, XEGIP faisant partie du protéome du nectar du tabac ornemental [Naqvi et al., 2005]; une XEGIP de la tomate [Qin et al., 2003]; EDGP, XEGIP de la carotte [Shang et al., 2004]. Ces homologies ainsi que la conservation des cystéines lors des alignements de séquences suggèrent des similarités dans leur fonction et dans leur structure tridimensionnelle. Les bases de données ainsi que la littérature font mention de l'existence de plusieurs homologues de XEGIPs pour une même plante : six homologues référencés chez la pomme de terre [Jones et al., 2006], cinq chez la tomate [Qin et al., 2003] ou encore deux chez la carotte [Shang et al., 2005] et le tabac [Xie et al., 2008]. Ces protéines ne sont néanmoins pas étudiées (absence de caractérisation enzymatique et d'étude d'expression) et à notre connaissance, ce projet de recherche est la seule étude comparative sur ces inhibiteurs.

La caractérisation des séquences nucléotiques des inhibiteurs de houblon a permis d'entreprendre la production hétérologue de ces protéines, en cellules d'insectes par sécrétion des protéines (Chapitre 3), afin de valider leur fonction putative, à savoir leur capacité à inhiber les GH12. Le choix a été fait de travailler avec des xyloglucanases d'*A. aculeatus* issues d'un cocktail enzymatique commercial (le Viscozyme), des enzymes présentes dans ce cocktail ayant été inhibées par les XEGIPs du tabac ou de la tomate [Qin et al., 2003, Naqvi et al., 2005]. La fonction inhibitrice de l'inhibiteur n° 1 et de l'inhibiteur n° 2 a été validée avec l'observation des inhibitions des activités, respectivement de 75 % et de 95 % (Chapitre 4). L'inhibiteur n° 3 n'a en revanche pas montré de capacité inhibitrice vis-à-vis de ces enzymes. Ces premiers résultats valident ainsi la fonction des XEGIPs de houblon et confirment l'existence de ces protéines auparavant inconnues chez le houblon et les cannabinaées. Il s'agit d'ailleurs de la première étude sur des XEGIPs issues d'une production hétérologue et montrant une très forte activité inhibitrice.

Les inhibiteurs recombinants ont également été mis en contact avec des enzymes de *F. graminearum*, champignon pathogène du houblon. Mis en croissance sur plusieurs substrats (son, rafles de maïs, parois de houblon, glucose), il sécrète un arsenal enzymatique diversifié de CWDEs [Phalip et al., 2009]. Les tests enzymatiques d'inhibition présentés dans ce manuscrit (Chapitre 4) ont clairement montré une réduction de l'activité xyloglucanase de ces mélanges enzymatiques. Ces résultats présentent une tendance très comparable à ceux obtenus avec le Viscozyme : une inhibition importante pour l'inhibiteur n° 2, une inhibition plus faible pour l'inhibiteur n° 1 et enfin une absence d'inhibition pour l'inhibiteur n° 3 (Chapitre 4). Les analyses supplémentaires de ces mélanges enzymatiques ont validé la présence de GH12 de *F. graminearum*, lesquelles ont été par la suite caractérisées dans ce travail.

A ce stade du projet, les différences de sensibilité des inhibiteurs amènent à supposer un rôle distinct de ces protéines. Par exemple, l'inhibiteur n° 1 pourrait être plus actif vis-à-vis d'une autre enzyme, l'inhibiteur n° 2 moins sensible à une seconde. Quant à l'inhibiteur n° 3, dont l'activité inhibitrice n'a pu être mise en évidence, il pourrait agir contre une autre famille d'enzymes. La découverte d'enzymes cibles pourrait permettre d'appréhender la spécificité et le rôle de l'inhibiteur n° 3. Les inhibiteurs de type XIP présentent la capacité d'inhiber à la fois les GH10 et les GH11. On peut ainsi supposer que de multiples enzymes ou classes d'enzymes peuvent être inhibées par les inhibiteurs de houblon. Une des techniques à privilégier pour cette étude serait la co-immunoprécipitation. La disponibilité d'anticorps monoclonaux permet d'envisager cette possibilité. Un criblage d'enzymes produites par des champignons pathogènes, saprophytes ou mycorrhiziens est alors à considérer. Par ailleurs, il est connu que certains inhibiteurs de xylanases (TAXI-II) ont la capacité d'inhiber uniquement les enzymes bactériennes. L'inhibiteur n° 3 pourrait présenter des spécificités similaires vis-à-vis des enzymes bactériennes. Les futures études devront prendre en compte une dimension plus vaste de la recherche d'enzymes cibles.

Les XEGIPs sont connues pour présenter de multiples homologues pour une même plante. Par exemple, la tomate comporte pas moins de six homologues de XEGIPs d'après les bases de données. On peut supposer l'existence d'autres inhibiteurs chez le houblon en plus des trois caractérisés. La mise en place de gel bidimensionnel pourrait permettre, outre la caractérisation des protéines natives du houblon, la mise en évidence d'autres inhibiteurs par immunodétection. De nouvelles protéines pourraient ainsi être détectées, occasionnant la mise à jour de spécificités enzymatiques particulières et compléter la compréhension de ces protéines dans les différentes voies de signalisation cellulaires.

C'est d'ailleurs le rôle chez la plante que les analyses en PCR quantitative ont pu appréhender (Chapitre 5). Les données obtenues sur les plants Sélection variétale et Fuggle montrent une tendance générale face à un stress biotique : une attaque fongique par *F. graminearum* induit plutôt l'expression de l'inhibiteur n° 2. Cet inhibiteur n'est de plus pas surexprimé dans la graine, qui est connue pour être une structure de résistance, et les cônes, qui sont protégés par la lupuline aux propriétés antimicrobiennes. Ce gène est par contre fortement exprimé dans la tige, tissu plus exposé au stress biotique. Les résultats obtenus avec ces deux mêmes variétés sont également cohérents lors de stress abiotique (blessures), où l'inhibiteur n° 1 est plus fortement exprimé que les deux autres. La forte l'expression de l'inhibiteur n° 3 lors de la germination et dans les cônes de houblon apporte une dimension nouvelle au(x) rôle(s) possible(s) de cet inhibiteur, qui pourrait intervenir dans la régulation des endo- β -1,4-glucanases endogènes. Des protéines de la famille des GH16 jouent en effet un rôle durant le développement de la plante, comme par exemple lors de la germination de la graine [Stratilová et al., 2010] ou la formation des fleurs femelles. L'inhibiteur n° 3, intervenant lors de certaines étapes de développement de la plante, serait capable d'inhiber cette famille d'enzymes.

Au vu de l'ensemble des résultats, nous pouvons proposer un modèle, illustré en figure 5.21 (page 166), où chaque inhibiteur aurait un rôle et une fonction distincte chez la plante. Le stress biotique induirait la synthèse de l'inhibiteur n° 2 et induirait l'inhibition de CWDEs comme démontré dans ce manuscrit. De plus, la formation de complexes inhibiteurs / enzymes permettrait, tout comme pour NEC4 chez le tabac, l'induction des mécanismes de défense de la plante de par un rôle d'effecteur dans les voies de signalisation. L'inhibiteur n° 2 pourrait ainsi être considéré, sous sa forme complexée avec l'enzyme, comme un éliciteur. De nouveaux stress biotiques pourraient être envisagés avec des champignons spécifiques au houblon (*Pseudoperonospora humuli*, *Sphaerotheca humuli*) ou des champignons opportunistes tels que *Trichoderma viride*. L'inhibiteur n° 1, à un degré moindre, aurait un rôle similaire à celui de l'inhibiteur n° 2 mais serait essentiellement induit lors de stress abiotiques, comme par exemple des coupures ou d'attaques d'insectes. En effet, les insectes broyeurs et suceurs occasionnent une rupture de la paroi végétale et l'étude de l'influence de ces nuisibles sur l'expression des inhibiteurs pourrait confirmer le rôle de l'inhibiteur n° 1. Enfin l'inhibiteur n° 3 aurait un rôle dans le développement de la plante notamment dans les étapes de germination et/ou de conaison. Des études protéiques sur les cônes de houblon pourraient permettre de déterminer les cibles potentielles de l'inhibiteur n° 3 et de vérifier les hypothèses le concernant. Ce projet pose donc beaucoup de questions et entraîne la continuation des travaux au laboratoire et peut-être dans d'autres équipes. Ces travaux permettent d'amender, de réfuter ou de valider le modèle proposé quant au rôle des inhibiteurs chez le houblon.

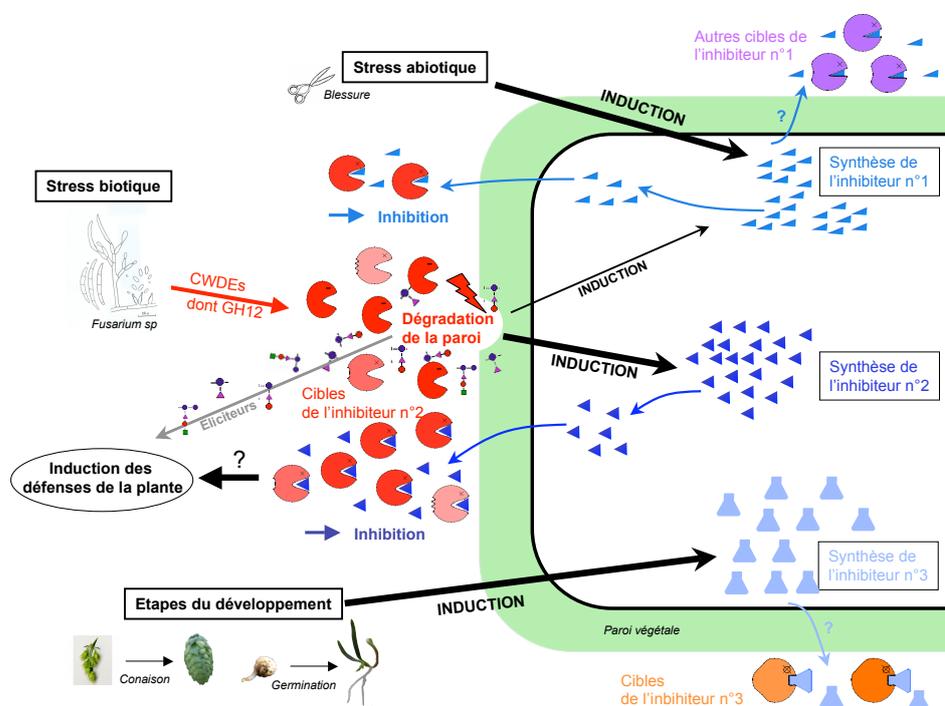


Figure 5.21 – Modèle proposé du rôle des inhibiteurs chez le houblon. Les enzymes spécifiques de l'inhibiteur n° 2 sont représentées en rouge. En violet et orange apparaissent les cibles potentielles des inhibiteurs n° 1 et n° 3. Les produits de dégradation de la paroi végétale sont représentés sous forme d'oligosaccharides.

Comme mentionné dans le chapitre 1, le houblon est soumis à une quantité importante de fongicides chimiques et leur réduction dans le cadre d'une agriculture durable est non seulement à envisager mais surtout à mettre en place. Une des perspectives à moyen et long terme de ce projet est l'utilisation des inhibiteurs en tant que substance active d'un produit phytosanitaire « biologique ». Le stress biotique représente chez le houblon un préjudice plus important que celui abiotique, réduit du fait de l'amélioration variétale et de l'amélioration des pratiques culturales durant ces dernières années. L'inhibiteur n° 2 a répondu positivement à l'inhibition d'enzymes de dégradation de la paroi végétale. Il est fort possible qu'il agisse également sur la croissance des champignons comme certains des inhibiteurs de xylanase. Il serait ainsi le candidat idéal pour la lutte fongique raisonnée en houblonnière.

ANNEXES

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

ARN	:	Acide RiboNucléique
ADNc/ADNg	:	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire/génomique
BLAST	:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
COPHOUDAL	:	COopérative des Planteurs de HOUblon d'ALSace
Ct	:	cycle de seuil (<i>Cycle threshold</i>)
CWDE	:	enzymes de dégradation de la paroi (<i>Cell Wall Degrading Enzyme</i>)
DO	:	Densité Optique
DsbA	:	<i>Disulfide oxidoreductase A</i>
dNTP	:	désoxyNucléotide TriPhosphate
GAPDH	:	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GH	:	Glycoside Hydrolase
HR	:	réaction hypersensible <i>Hypersensitive Reaction</i>
IGMBC	:	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IPTG	:	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
kDa	:	kiloDalton
LB	:	Luria Bertani
LRR	:	domaine riche en leucine <i>Leucine-Rich Repeat</i>
MALDI-TOF	:	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time-Of-Flight</i>
NIH	:	<i>National Institutes of Health (USA)</i>
OGA	:	acide oligogalacturonique <i>OligoGalacturonic Acid</i>
PAMP	:	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
pb	:	paire de bases
PBS	:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	:	réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	:	PolyEthylène Glycol
PGIP	:	<i>PolyGalacturonase-Inhibiting Protein</i>
PR-protein	:	<i>Pathogenesis-Related protein</i>
RACE	:	amplification rapide des extrémités 5' et 3' des ADNc (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)
RuBisCO	:	ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase (<i>Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygenase</i>)
ROS	:	espèces réactives de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SAR	:	résistance systémique acquise (<i>Systemic Acquired Resistance</i>)
SDS-PAGE	:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
TAXI	:	<i>Triticum aestivum Xylanase-Inhibitor</i>
TLXI	:	<i>Thaumatococcus-like Xylanase Inhibitor</i>
Tm	:	température de fusion (<i>Melting temperature</i>)
XEG	:	<i>Xyloglucan-specific EndoGlucanase</i>
XEGIP	:	<i>Xyloglucan-specific EndoGlucanase Inhibitor Proteins</i>
XIP	:	<i>Xylanase-Inhibitor Protein</i>

TABLE DES FIGURES

1.1	Lithographie représentant <i>Humulus lupulus</i> (source : [Thomé, 1905]).	3
1.2	Cônes femelles de houblon (source : laboratoire)	4
1.3	Houblonnières (source : laboratoire).	5
1.4	Les insectes nuisibles du houblon (source : Fig. 1.4a : [Briggs et al., 2004]; Fig. 1.4b : Olivier Habrylo; Fig. 1.4c : COPHOUDAL; Fig. 1.4d : United States Department of Agriculture, http://www.sel.barc.usda.gov ; Fig. 1.4e : http://lime.fa.gau.hu).	7
1.5	Aperçu de symptômes sur le houblon causés par des pathogènes fongiques (source : COPHOUDAL).	9
1.6	Spores de <i>F. graminearum</i> (source : http://indoorpol.wiv-isp.be).	11
1.7	Liane de houblon contaminée par <i>Neofusicoccum parvum</i> (source : laboratoire).	12
1.8	Schéma de la paroi végétale (source : [Taiz and Zeiger, 2002b]).	14
1.9	Schéma de la paroi primaire (source : [Taiz and Zeiger, 2002a]).	15
1.10	Schéma des xyloglucanes (source : http://www.snv.jussieu.fr).	15
1.11	Nomenclature utilisée pour décrire les segments de xyloglucane (source : [Powlowski et al., 2009]).	16
1.12	Schéma des interactions plantes/pathogènes (source : [Misas-Villamil and van der Hoorn, 2008]).	22
1.13	Production de ROS par la plante lors d'un stress (source : [Mullineaux and Baker, 2010]).	25
1.14	Schématisation des réactions de défense induites lors d'une interaction plante / pathogène (source : [Desender et al., 2007]).	26
1.15	Structures moléculaires d'inhibiteurs de CWDEs.	28
2.1	Séquence de l'EST.	42
2.2	Séquence de la 3'RACE NUP-RevRinhx7 sur le plant mâle.	44
2.3	Séquence de la 5'RACE NUP-Rinhx7 sur le plant mâle.	45
2.4	Séquence protéique complète issue des RACEs 3' et 5' sur le plant mâle.	46
2.5	Séquence de la 3'RACE NUP-RevRinhx7 sur le plant femelle.	47
2.6	Séquence du clone 1 de la 5'RACE NUP-Rinhx7 sur le plant femelle.	48
2.7	Séquence du clone 5 de la 5'RACE NUP-Rinhx7 sur le plant femelle.	48
2.8	Schéma représentant les différentes étapes ayant conduit à l'obtention de trois séquences codants pour des XEGIPs.	49
2.9	Séquences protéiques complètes des trois inhibiteurs sur le plant femelle.	50
2.10	Alignement des séquences protéiques des trois inhibiteurs.	52
2.11	Alignement de XEGIPs et mise en évidence de la conservation des cystéines.	54
2.12	Arbre phylogénétique.	55
2.13	Produits de PCR à partir d'extraits d'ADN génomique de <i>C. sativa</i> ou de <i>L. albus</i>	56
3.1	Séquence protéique de l'inhibiteur n° 1 dans le vecteur pET-30a.	66
3.2	Séquence protéique de l'inhibiteur n° 1 dans le vecteur pET-39b.	67
3.3	Séquence protéique de l'inhibiteur n° 2 dans le vecteur pPICZαB.	68
3.4	Séquence protéique de l'inhibiteur n° 2 dans le vecteur pPICZB.	68
3.5	Séquence protéique de l'inhibiteur n° 3 dans le vecteur pAcGP67B.	69

3.6	Alignement des trois inhibiteurs.	75
3.7	SDS-PAGE montrant le couplage effectif du peptide et de l'ovalbumine.	76
3.8	Schéma représentatif du transfert des protéines sur membrane.	76
3.9	SDS-PAGE d'échantillons de culture de l'inhibiteur n° 1 mâle dans le pET-30a.	78
3.10	SDS-PAGE d'échantillons issus de purification par chromatographie d'affinité.	80
3.11	Mise en évidence de la spécificité des anticorps polyclonaux.	81
3.12	Spectre d'absorbance des protéines sous forme précipitées et solubles.	82
3.13	Résultats obtenus lors de travaux sur les corps d'inclusion.	83
3.14	Résultats de la production des protéines issues de constructions dans les souches ArcticExpress™ et SHuffle™.	85
3.15	Western blot des échantillons des inhibiteurs produits dans le vecteur pET-39b.	87
3.16	SDS-PAGE et western blot des résultats des inhibiteurs de purification des inhibiteurs dans le vecteur pPICZB.	89
3.17	SDS-PAGE et western blot obtenus lors des travaux en cellules d'insectes avec le vecteur pAcSG His.	91
3.18	SDS-PAGE et western blots effectués sur des échantillons issus de surnageants de culture lors de constructions en vecteur pAcGP67B.	93
3.19	Observations microscopiques (grossissement x 2000) de cellules d'insectes après infection virale.	93
3.20	Position de l'épitope des anticorps polyclonaux de l'inhibiteur n° 1.	95
4.1	Exemple de tests d'inhibition négatifs mettant en interaction des protéines recombinantes d' <i>E. coli</i> ou de cellules d'insectes dans le vecteur pAcSG avec plusieurs enzymes sur xyloglucane.	105
4.2	Action inhibitrice de surnageants de culture en cellules d'insectes dans le vecteur pAcGP67B mis en contact avec le Viscozyme sur un substrat AZCL-xyloglucane.	107
4.3	Action inhibitrice du surnageant de l'inhibiteur n° 2 de culture en cellules d'insectes, après optimisation, au temps 72 h et 96 h, avec le Viscozyme sur un substrat AZCL-xyloglucane.	109
4.4	Action inhibitrice de surnageants de culture en cellules d'insectes, après optimisation, mis en contact avec le Viscozyme sur un substrat AZCL-xyloglucane.	110
4.5	Action inhibitrice du surnageant de culture de l'inhibiteur n° 2 en cellules d'insectes mis en contact avec des surnageants de culture de <i>F. graminearum</i> (son de blé et rafles de maïs).	112
4.6	Action inhibitrice du surnageant de culture de l'inhibiteur n° 2 produit en cellules d'insectes mis en contact avec des surnageants de culture de <i>F. graminearum</i> (parois de houblon et glucose).	113
4.7	RT-PCR effectuée à partir d'ADNc de <i>F. graminearum</i> cultivé sur CMC et sur bouleau.	115
4.8	SDS-PAGE représentant les éluats de purification des GH12 de <i>F. graminearum</i>	115
4.9	Séquences protéiques complètes des quatre GH12 de <i>F. graminearum</i>	116
4.10	Interaction des inhibiteurs recombinants produits dans le système en cellules d'insectes et deux enzymes, une GH12 et une GH11 de <i>F. graminearum</i>	119
4.11	Position du centre actif des inhibiteurs de houblon par superposition avec un inhibiteur de type TAXI-I.	121
4.12	Visualisation tridimensionnelle de l'interaction entre un inhibiteur de type TAXI-I et une GH11 d' <i>A. niger</i>	123
4.13	Comparaison des résidus impliqués dans la capacité inhibitrice de TAXI-I et des inhibiteurs de houblon.	124
4.14	Alignement et centre actif de GH12 dont celles de <i>F. graminearum</i>	127
5.1	Photographies représentant les différents stades de prélèvement.	137
5.2	Propagation de <i>F. graminearum</i> par la nervure principale sur une feuille de houblon.	138
5.3	Propagation de <i>F. graminearum</i> par une blessure sur une feuille de houblon.	139
5.4	<i>Alternaria sp.</i>	139
5.5	<i>Sclerotinia sclerotinium</i>	140

5.6	SDS-PAGE des échantillons protéiques de houblon lors du fractionnement par l'utilisation du PEG.	141
5.7	Résultats obtenus lors des travaux de suppression de la RuBisCO par l'utilisation du couple acide phytique / chlorure de calcium.	143
5.8	PCR réalisée à partir d'ADN plasmidique des inhibiteurs et les amorces utilisées lors de la quantification en PCR.	144
5.9	Produits de PCR quantitative obtenus à partir d'ADNc de houblon et de <i>F. graminearum</i>	145
5.10	Traitement des données de PCR quantitative.	146
5.11	Expression relative des inhibiteurs chez plusieurs variétés.	147
5.12	Expression relative des inhibiteurs chez plusieurs variétés.	148
5.13	Expression relative des inhibiteurs au cours de la germination.	149
5.14	Expression relative des inhibiteurs au cours de la germination.	150
5.15	Distribution des inhibiteurs dans différents tissus de la plante.	151
5.16	Distribution des inhibiteurs dans différents tissus de la plante.	152
5.17	Expression relative des gènes codant les inhibiteurs 72 h après blessures et inoculation de champignon d'un plant de houblon Sélection variétale.	154
5.18	Expression relative des gènes codant les inhibiteurs après blessure de plants de houblon Sélection variétale.	155
5.19	Expression relative des gènes codant les inhibiteurs après inoculation de spores sur un plant issu de la sélection variétale.	156
5.20	Expression relative des gènes codant les inhibiteurs après inoculation de spores sur la variété Fuggle.	157
5.21	Modèle proposé du rôle des inhibiteurs chez le houblon.	166

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Evolution de la superficie des surfaces houblonnières en France (Source : [Group, 2010]).	6
1.2	Composition du chanvre (source : [Godin et al., 2010].)	17
1.3	Composition en oses de feuilles de houblon (source : [Glocker et al., 1993]).	17
1.4	Composition en sucres de déchets post-récoltes de houblon (source : laboratoire).	17
1.5	Importance des enzymes fongiques en industrie (source : [Kavanagh, 2005]).	18
1.6	Les différents types de réaction de pathogénicité (source : [Hammond-Kosack and Kanyuka, 2007]).	21
2.1	Amorces utilisées lors du chapitre 2 dans le cadre des travaux de RACE.	39
2.2	Amorces supplémentaires utilisées lors du chapitre 2.	39
2.3	BLASTx à partir de la séquence initiale de l'EST.	43
2.4	Données relatives au clonage suite à la RACE en 5'.	47
2.5	Pourcentage d'identité et de similarité protéiques des trois inhibiteurs.	51
2.6	Données générales sur les inhibiteurs.	51
2.7	Sites prédits des ponts disulfures.	53
2.8	Sites prédits des N- et O-glycosylations.	54
2.9	Comparaison des séquences protéiques des inhibiteurs des plants mâle et femelle.	57
3.1	Antibiotiques utilisés pour les différents systèmes d'expression.	64
3.2	Amorces utilisées lors du chapitre 3.	70
3.3	Résultats issus de l'analyse en MALDI-TOF des bandes protéiques obtenues sur gel SDS-PAGE en pET-30a.	79
4.1	Amorces utilisées lors du chapitre 4.	102
4.2	Données relatives à l'élaboration des structures tridimensionnelles prédites des GH12 de <i>F. graminearum</i>	103
4.3	Spécificité de substrats des quatre GH12 de <i>F. graminearum</i>	117
5.1	Amorces utilisées lors du chapitre 5	135

BIBLIOGRAPHIE

- [Acquadro et al., 2009] Acquadro, A., Falvo, S., Mila, S., Giuliano Albo, A., Comino, C., Moglia, A., and Lanteri, S. (2009). Proteomics in globe artichoke : Protein extraction and sample complexity reduction by PEG fractionation. *Electrophoresis*, 30(9) :1594–1602.
- [Akimitsu et al., 2004] Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., and Prusky, D. (2004). Sugars and pH : A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(6) :271–275.
- [Altschul et al., 1997] Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17) :3389.
- [Arnold et al., 2006] Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace : a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2) :195.
- [Bannai, 2010] Bannai, H. (2010). iPSORT, <http://ipsort.hgc.jp/>.
- [Bar et al., 2010] Bar, M., Sharfman, M., Ron, M., and Avni, A. (2010). BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *The Plant Journal*, 63(5) :791–800.
- [Bartsch et al., 2006] Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J., Bautor, J., and Parker, J. (2006). Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in Arabidopsis immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7. *The Plant Cell Online*, 18(4) :1038–1051.
- [Batista et al., 1996] Batista, D., Sousa, M., and Pais, M. (1996). Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L.(hop) clone Bragança and var. Brewers Gold. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(1) :37–41.
- [Beaugrand et al., 2006] Beaugrand, J., Gebruers, K., Ververken, C., Fierens, E., Croes, E., Goddeeris, B., Courtin, C., and Delcour, J. (2006). Antibodies against wheat xylanase inhibitors as tools for the selective identification of their homologues in other cereals. *Journal of Cereal Science*, 44(1) :59–67.
- [Beitz, 2000] Beitz, E. (2000). TeXshade : shading and labeling of multiple sequence alignments using L^AT_EX. *Bioinformatics*, 16(2) :135.
- [Beliën et al., 2005] Beliën, T., Van Campenhout, S., Van Acker, M., and Volckaert, G. (2005). Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(2) :407–414.

- [Bois, 1996] Bois, D. (1996). Les plantes alimentaires. bière. In *Vigne, café, cacao et d'autres plantes à boire*, pages 182–189. Rive Droite.
- [Bonnin et al., 2005] Bonnin, E., Daviet, S., Gebruers, K., Delcour, J. A., Goldson, A., Juge, N., and Saulnier, L. (2005). Variation in the levels of the different xylanase inhibitors in grain and flour of 20 french wheat cultivars. *Journal of Cereal Science*, 41(3) :375 – 379.
- [Boukari et al., 2011] Boukari, I., O'Donohue, M., Rémond, C., and B., C. (2011). Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds : Role of functional phenolic groups. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, In Press, Accepted Manuscript.
- [Bradford, 1976] Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2) :248–254.
- [Briggs et al., 2004] Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., and Stevens, R. (2004). *Brewing : science and practice*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LCC.
- [Cantarel et al., 2009] Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy) : an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37 :233–238.
- [Caragea et al., 2007] Caragea, C., Sinapov, J., Silvescu, A., Dobbs, D., and Honavar, V. (2007). Glycosylation site prediction using ensembles of support vector machine classifiers. *BMC bioinformatics*, 8(1) :438–451.
- [Carapito et al., 2009] Carapito, R., Carapito, C., Jeltsch, J., and Phalip, V. (2009). Efficient hydrolysis of hemicellulose by a *Fusarium graminearum* xylanase blend produced at high levels in *Escherichia coli*. *Bioresource technology*, 100(2) :845–850.
- [Cerenak et al., 2009] Cerenak, A., Satovic, Z., Jakse, J., Luthar, Z., Carovic-Stanko, K., and Javornik, B. (2009). Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus Lupulus* L.). *Euphytica*, 170(1) :141–154.
- [Choi and Lee, 2004] Choi, J. and Lee, S. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(5) :625–635.
- [Chou et al., 2010] Chou, K., Shen, H., and Newbigin, E. (2010). Plant-mPLoc : A Top-Down Strategy to Augment the Power for Predicting Plant Protein Subcellular Localization. *PloS one*, 5(6) :259–270.
- [Clark, 2001] Clark, E. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2) :202–207.
- [Consonni et al., 2010] Consonni, A., Lovati, M. R., Manzoni, C., Pizzagalli, A., Morazzoni, P., and Duranti, M. (2010). Cloning, yeast expression, purification and biological activity of a truncated form of the soybean 7S globulin α subunit involved in Hep G2 cell cholesterol homeostasis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(9) :887–891.
- [Corbaz, 1990] Corbaz, R. (1990). Réaction de l'hôte. In *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*, chapitre 4. PPUR presses polytechniques.
- [Croes et al., 2009a] Croes, E., Gebruers, K., Carpentier, S., Swennen, R., Robben, J., Laukens, K., Witters, E., Delcour, J., and Courtin, C. (2009a). A quantitative portrait of three xylanase inhibiting protein families in different wheat cultivars using 2D-DIGE and multivariate statistical tools. *Journal of Proteomics*, 72(3) :484–500.
- [Croes et al., 2009b] Croes, E., Gebruers, K., Luyten, N., Delcour, J., and Courtin, C. (2009b). Immunoblot quantification of three classes of proteinaceous xylanase inhibitors in different wheat (*Triticum aestivum*) cultivars and milling fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(3) :1029–1035.
- [Croes et al., 2009c] Croes, E., Gebruers, K., Luyten, N., Delcour, J., and Courtin, C. (2009c). The three classes of wheat xylanase-inhibiting proteins accumulate in an analogous way during wheat ear development and germination. *Journal of plant physiology*, 166(12) :1253–1262.
- [Danilova and Karlov, 2006] Danilova, T. and Karlov, G. (2006). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 151(1) :15–21.

- [De Groot and Ventura, 2006] De Groot, N. and Ventura, S. (2006). Protein activity in bacterial inclusion bodies correlates with predicted aggregation rates. *Journal of biotechnology*, 125(1) :110–113.
- [de Vries, 2003] de Vries, R. (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(1) :10–20.
- [de Vries and Visser, 2001] de Vries, R. P. and Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4) :497–522.
- [Debyser et al., 1997] Debyser, W., Derdelinckx, G., and Delcour, J. (1997). Arabinoxylan solubilization and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during mashing with wheat wholemeal adjunct : evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 55(4) :153–156.
- [Debyser et al., 1999] Debyser, W., Peumans, W., Van Damme, E., and Delcour, J. (1999). *Triticum aestivum* xylanase inhibitor (TAXI), a new class of enzyme inhibitor affecting breadmaking performance. *Journal of cereal science*, 30(1) :39–43.
- [Demain and Vaishnav, 2009] Demain, A. and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3) :297–306.
- [Dereeper et al., 2008] Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr : robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36 :465–469.
- [Desender et al., 2007] Desender, S., Andrivon, D., and Val, F. (2007). Activation of defence reactions in solanaceae : where is the specificity ? *Cellular Microbiology*, 9(1) :21–30.
- [Di Matteo et al., 2003] Di Matteo, A., Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D., and Cervone, F. (2003). The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17) :10124.
- [Direction Générale de l’Agriculture et du Développement Rural, 2009] Direction Générale de l’Agriculture et du Développement Rural (2009). Evaluation of the CAP measures related to hops. Technical report, Commission Européenne.
- [Ditt et al., 2001] Ditt, R. F., Nester, E. W., and Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19) :10954–10959.
- [Doi and Kosugi, 2004] Doi, R. and Kosugi, A. (2004). Cellulosomes : plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(7) :541–551.
- [Dornez et al., 2010] Dornez, E., Croes, E., Gebruers, K., De Coninck, B., Cammue, B., Delcour, J., and Courtin, C. (2010). Accumulated evidence substantiates a role for three classes of wheat xylanase inhibitors in plant defense. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(4) :244–264.
- [Douaiher et al., 2007] Douaiher, M., Nowak, E., Durand, R., Halama, P., and Reignault, P. (2007). Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall-degrading enzymes produced in vitro : the importance of xylanase and polygalacturonase. *Plant Pathology*, 56(1) :79–86.
- [D’Ovidio et al., 2004a] D’Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., and Bellincampi, D. (2004a). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1696(2) :237–244.
- [D’Ovidio et al., 2004b] D’Ovidio, R., Raiola, A., Capodicasa, C., Devoto, A., Pontiggia, D., Roberti, S., Galletti, R., Conti, E., O’Sullivan, D., and De Lorenzo, G. (2004b). Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiology*, 135(4) :2424–2435.
- [Dunez et al., 1988a] Dunez, J., Sutic, D., Smith, I., Dunez, J., Lelliott, R., Phillips, D., and Archer, S. (1988a). Ascomycete I. In *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell Scientific Publications.

- [Dunez et al., 1988b] Dunez, J., Sutic, D., Smith, I., Dunez, J., Lelliott, R., Phillips, D., and Archer, S. (1988b). Oomycetes. In *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell Scientific Publications.
- [Durand et al., 2005] Durand, A., Hughes, R., Roussel, A., Flatman, R., Henrissat, B., and Juge, N. (2005). Emergence of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18. *FEBS J*, 272(7) :1745–1755.
- [Dwek, 1998] Dwek, R. (1998). Biological importance of glycosylation. *Developments in biological standardization*, 96 :43–47.
- [Dyakov et al., 2007] Dyakov, Y., Dzhavakhiya, V., and Korpela, T. (2007). Immune response. In *Comprehensive and molecular phytopathology*, chapitre 10. Elsevier Science Ltd.
- [Elliott et al., 2002] Elliott, G. O., Hughes, R. K., Juge, N., Kroon, P. A., and Williamson, G. (2002). Functional identification of the cDNA coding for a wheat endo-1,4-L-D-xylanase inhibitor. *FEBS Letters*, 519 :66–70.
- [Esposito and Chatterjee, 2006] Esposito, D. and Chatterjee, D. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current opinion in biotechnology*, 17(4) :353–358.
- [Faivre et al., 2007] Faivre, C., Ghedira, K., Goetz, P., Lejeune, R., and Staub, H. (2007). *Humulus lupulus* L. *Phytothérapie*, 5(2) :86–89.
- [Feller et al., 2008] Feller, U., Anders, I., and Mae, T. (2008). Rubiscolytics : fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany*, 59(7) :1615–1624.
- [Ferre and Clote, 2005] Ferre, F. and Clote, P. (2005). DiANNA : a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic acids research*, 33 :230–232.
- [Ferreira et al., 2007] Ferreira, R., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C., Chen, Z., Batista, L., Duarte, J., Borges, A., and Teixeira, A. (2007). The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 8(5) :677–700.
- [Fierens et al., 2008] Fierens, E., Gebruers, K., Courtin, C., and Delcour, J. (2008). Xylanase inhibitors bind to nonstarch polysaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(2) :564–570.
- [Fierens et al., 2009] Fierens, E., Gebruers, K., Voet, A., De Maeyer, M., Courtin, C., and Delcour, J. (2009). Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(3) :646–654.
- [Fierens et al., 2007] Fierens, E., Rombouts, S., Gebruers, K., Goesaert, H., Brijs, K., Beaugrand, J., Volckaert, G., Van Campenhout, S., Proost, P., Courtin, C., et al. (2007). TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochemical Journal*, 403(3) :583–591.
- [Fierens et al., 2003] Fierens, K., Brijs, K., Courtin, C. M., Gebruers, K., Goesaert, H., Raedschelders, G., Robben, J., Van Campenhout, S., Volckaert, G., and Delcour, J. A. (2003). Molecular identification of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-I, member of a new class of plant proteins. *FEBS Letters*, 540(1-3) :259–263.
- [Fierens et al., 2004] Fierens, K., Geudens, N., Brijs, K., Courtin, C. M., Gebruers, K., Robben, J., Van Campenhout, S., Volckaert, G., and Delcour, J. A. (2004). High-level expression, purification, and characterization of recombinant wheat xylanase inhibitor TAXI-I secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 37(1) :39–46.
- [Fierens et al., 2005] Fierens, K., Gils, A., Sansen, S., Brijs, K., Courtin, C., Declerck, P., De Ranter, C., Gebruers, K., Rabijns, A., Robben, J., et al. (2005). His374 of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-I stabilizes complex formation with glycoside hydrolase family 11 endoxylanases. *FEBS Journal*, 272(22) :5872–5882.
- [Flatman et al., 2002] Flatman, R., McLauchlan, W. R., Juge, N., Furniss, C., Berrin, J. G., Hughes, R. K., Manzanares, P., Ladbury, J. E., O'Brien, R., and Williamson, G. (2002). Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein XIP-I from wheat. *Biochemical Journal*, 365(3) :773–781.

- [Forster et al., 2008] Forster, A., Carapito, R., Phalip, V., Habrylo, O., Jeltsch, J., and Hatsch, D. (2008). Tackling *Humulus lupulus* fungal diseases by studying a hop cell wall/fusarium graminearum model. In *II International Humulus Symposium 848*, pages 103–114.
- [Gebruers et al., 2002] Gebruers, K., Courtin, C., Goesaert, H., Campenhout, S., and Delcour, J. (2002). Endoxylanase inhibition activity in different european wheat cultivars and milling fractions. *Cereal chemistry*, 79(5) :613–616.
- [Gebruers et al., 2001] Gebruers, K., Debyser, W., Goesaert, H., Proost, P., et al. (2001). *Triticum aestivum* L. endoxylanase inhibitor (TAXI) consists of two inhibitors, TAXI I and TAXI II, with different specificities. *Biochemical Journal*, 353(2) :239–244.
- [Gent et al., 2009] Gent, D., Nelson, M., Farnsworth, J., and Grove, G. (2009). PCR detection of *Pseudoperonospora humuli* in air samples from hop yards. *Plant Pathology*, 58(6) :1081–1091.
- [Gent et al., 2008] Gent, D., Nelson, M., and Grove, G. (2008). Persistence of phenylamide insensitivity in *Pseudoperonospora humuli*. *Plant Disease*, 92(3) :463–468.
- [Gent et al., 2010] Gent, D., Ocomb, C., and Farnsworth, J. (2010). Forecasting and management of hop downy mildew. *Plant Disease*, 94(4) :425–431.
- [Glocker et al., 1993] Glocker, M., Su, H., and Deinzer, M. (1993). Structure elucidation of hop plant (*Humulus lupulus*) phytoalexin elicitors by fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10) :1558–1565.
- [Godin et al., 2010] Godin, B., Ghysel, F., Agneessens, R., Schmit, T., Gofflot, S., Lamaudière, S., Sinnaeve, G., Goffart, J., Gerin, P., Stilmant, D., and Delcarte, J. (2010). Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(2) :549–560.
- [Goedegebuur et al., 2002] Goedegebuur, F., Fowler, T., Phillips, J., van der Kley, P., van Solingen, P., Dankmeyer, L., and Power, S. (2002). Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Current genetics*, 41(2) :89–98.
- [Goesaert et al., 2004] Goesaert, H., Elliott, G., Kroon, P. A., Gebruers, K., Courtin, C. M., Robben, J., Delcour, J. A., and Juge, N. (2004). Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696(2) :193–202.
- [Golovanov et al., 2004] Golovanov, A., Hautbergue, G., Wilson, S., and Lian, L. (2004). A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(29) :8933–8939.
- [Goswami and Kistler, 2004] Goswami, R. and Kistler, H. (2004). Heading for disaster : *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6) :515–525.
- [Grasswitz and James, 2008] Grasswitz, T. R. and James, D. G. (2008). Biology, phenology and control of *Hypena humuli* (Lepidoptera : Noctuidae), an emerging pest of hops (*Humulus lupulus*) (Cannabaceae) in the USA. *International Journal of Pest Management*, 54(4) :333–338.
- [Grenville-Briggs et al., 2010] Grenville-Briggs, L., Avrova, A., Hay, R., Bruce, C., Whisson, S., and van West, P. (2010). Identification of appressorial and mycelial cell wall proteins and a survey of the membrane proteome of *Phytophthora infestans*. *Fungal Biology*, 114(9) :702–723.
- [Grishutin et al., 2004] Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Markov, A. V., Ustinov, B. B., Semenova, M. V., and Sinitsyn, A. P. (2004). Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674(3) :268–281.
- [Group, 2010] Group, B. H. (2010). The barth report, hops 2009-2010. Technical report, Barth Haas Group.
- [Gryndler et al., 2008] Gryndler, M., Krofta, K., Gryndlerová, H., Soukupová, L., Hršelová, H., and Gabriel, J. (2008). Potentially dangerous fusarioid microorganisms associated with rot of hop (*Humulus lupulus* L.) plants in field culture. *Plant, Soil and Environment*, 54(4) :149–154.
- [Guindon and Gascuel, 2003] Guindon, S. and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5) :696–704.
- [Gusakov, 2010] Gusakov, A. (2010). Proteinaceous inhibitors of microbial xylanases. *Biochemistry (Moscow)*, 75(10) :1185–1199.

- [Gutjahr and Paszkowski, 2009] Gutjahr, C. and Paszkowski, U. (2009). Weights in the balance : jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7) :763–772.
- [Habrylo et al., en préparation] Habrylo, O., Song, X., Forster, A., and Phalip, V. Characterization of the four GH12 endoxylanases from the plant pathogen *Fusarium graminearum*.
- [Hammond-Kosack and Kanyuka, 2007] Hammond-Kosack, K. and Kanyuka, K. (2007). Resistance genes (R genes) in plants. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley Online Library.
- [Harper et al., 2010] Harper, A. D., Stalnaker, S. H., Wells, L., Darvill, A., Thornburg, R., and York, W. S. (2010). Interaction of Nectarin 4 with a fungal protein triggers a microbial surveillance and defense mechanism in nectar. *Phytochemistry*, 71(17-18) :1963–1969.
- [Hartinger et al., 2010] Hartinger, D., Heinel, S., Schwartz, H., Grabherr, R., Schatzmayr, G., Haltrich, D., and Moll, W. (2010). Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B1. *Microbial Cell Factories*, 62(9).
- [Hashimoto and Komatsu, 2007] Hashimoto, M. and Komatsu, S. (2007). Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics*, 7(8) :1293–1302.
- [Hatsch et al., 2006] Hatsch, D., Phalip, V., Petkovski, E., and Jeltsch, J. (2006). *Fusarium graminearum* on plant cell wall : no fewer than 30 xylanase genes transcribed. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(3) :959–966.
- [Hématy et al., 2009] Hématy, K., Cherk, C., and Somerville, S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current opinion in plant biology*, 12(4) :406–413.
- [Henrissat, 1991] Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280 :309–316.
- [Henrissat and Bairoch, 1993] Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal*, 293 :781–788.
- [Horton et al., 2007] Horton, P., Park, K., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., and Nakai, K. (2007). WoLF PSORT : protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35 :585–587.
- [Idicula-Thomas and Balaji, 2007] Idicula-Thomas, S. and Balaji, P. (2007). Protein aggregation : A perspective from amyloid and inclusion-body formation. *Current Science*, 92 :758–767.
- [Igawa et al., 2004] Igawa, T., Ochiai-Fukuda, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Shibata, T., Yamaguchi, I., and Kimura, M. (2004). New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat. *Plant Cell Physiology*, 45(10) :1347–1360.
- [Igawa et al., 2005] Igawa, T., Tokai, T., Kudo, T., Yamaguchi, I., and Kimura, M. (2005). A wheat xylanase inhibitor gene, Xip-I, but not Taxi-I, is significantly induced by biotic and abiotic signals that trigger plant defense. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(5) :1058–1063.
- [Ihaka and Gentleman, 1996] Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996). R : a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*, 5(3) :299–314.
- [Jakše et al., 2002] Jakše, J., Bandelj, D., and Javornik, B. (2002). Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Ecology Notes*, 2(4) :544–546.
- [James, 2003] James, D. (2003). Pesticide susceptibility of two coccinellids (*Stethorus punctum picipes* and *Harmonia axyridis*) important in biological control of mites and aphids in Washington hops. *Biocontrol science and technology*, 13(2) :253–259.
- [Jeltsch et al., 2010] Jeltsch, J.-M., Habrylo, O., Forster, A., , and Phalip, V. (2010). Programme de R&D houblon. déperissement et création variétale. Technical report, A.G.P.H. (Association générale des producteurs de houblon).
- [Jones et al., 2006] Jones, R., Ospina-Giraldo, M., and Deahl, K. (2006). Gene silencing indicates a role for potato endoglucanase inhibitor protein in germplasm resistance to late blight. *American Journal of Potato Research*, 83(1) :41–46.
- [Jonkers and Rep, 2009] Jonkers, W. and Rep, M. (2009). Mutation of CRE1 in *Fusarium oxysporum* reverts the pathogenicity defects of the FRP1 deletion mutant. *Molecular microbiology*, 74(5) :1100–1113.

- [Joseph and Andreotti, 2008] Joseph, R. E. and Andreotti, A. H. (2008). Bacterial expression and purification of interleukin-2 tyrosine kinase : single step separation of the chaperonin impurity. *Protein Expression and Purification*, 60(2) :194–197.
- [Juge et al., 2004] Juge, N., Payan, F., and Williamson, G. (2004). XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat : a novel protein function. *Biochim Biophys Acta*, 1696(2) :203–211.
- [Kac et al., 2008] Kac, J., Plazar, J., Mlinaric, A., Zegura, B., Lah, T., and Filipic, M. (2008). Antimutagenicity of hops (*Humulus lupulus* l.) : bioassay-directed fractionation and isolation of xanthohumol. *Phytomedicine*, 15(3) :216–220.
- [Kämper et al., 2006] Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L., Brefort, T., Saville, B., Bannett, F., Kronstad, J., Gold, S., Müller, O., et al. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115) :97–101.
- [Kavanagh, 2005] Kavanagh, K. (2005). Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi. In *Fungi : biology and applications*. John Wiley & Sons Inc.
- [Kikot et al., 2009] Kikot, G., Hours, R., and Alconada, T. (2009). Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum* : a review. *Journal of basic microbiology*, 49(3) :231–241.
- [Kim et al., 2001] Kim, S., Cho, K., Jang, Y., and Kang, K. (2001). Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, 22(10) :2103–2109.
- [Kim et al., 2009] Kim, S., Wang, Y., Kang, S., Kim, S., Rakwal, R., Kim, Y., and Kang, K. (2009). Developing rice embryo proteomics reveals essential role for embryonic proteins in regulation of seed germination. *Journal of proteome research*, 8(7) :3598–3605.
- [Klotz, 2010] Klotz, C. (2010). Le rapprochement entre le comptoir agricole et la cophoudal est en marche. *Au fil des saisons. Le journal des adhérents du comptoir agricole*, (32) :4–5.
- [Klotz, 2011] Klotz, C. (2011). Le houblon au comptoir agricole : les choses se mettent en place. *Au fil des saisons. Le journal des adhérents du comptoir agricole*, (35) :3.
- [Kozjak et al., 2009] Kozjak, P., Jakse, J., and Javornik, B. (2009). Isolation and sequence analysis of NBS-LRR disease resistance gene analogues from hop *Humulus lupulus* L. *Plant Science*, 176(6) :775–782.
- [Krishnan and Natarajan, 2009] Krishnan, H. and Natarajan, S. (2009). A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. *Phytochemistry*, 70(17–18) :1958–1964.
- [Laemmli et al., 1970] Laemmli, U. et al. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259) :680–685.
- [Lagaert et al., 2009] Lagaert, S., Beliën, T., and Volckaert, G. (2009). Plant cell walls : protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. In *Seminars in cell & developmental biology*, volume 20, pages 1064–1073.
- [Le Roux et al., 2008] Le Roux, V., Brunissen, L., Vincent, C., and Giordanengo, P. (2008). Amélioration génétique de la pomme de terre et résistance aux pucerons : du terrain à la réponse moléculaire de la plante. *Cahiers Agricultures*, 17(4) :401–406.
- [Lee et al., 2006] Lee, S., Carpenter, J., Chang, B., Randolph, T., and Kim, Y. (2006). Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. *Protein Science*, 15(2) :304–313.
- [Liu et al., 2007] Liu, Y., Gu, X., Tang, J., and Liu, K. (2007). Antioxidant activities of hops (*Humulus lupulus*) and their products. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(2) :116–121.
- [Livak and Schmittgen, 2001] Livak, K. and Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4) :402–408.
- [Maloukh et al., 2009] Maloukh, L., Matousek, J., Bockstaele, E., and Roldán-Ruiz, I. (2009). Housekeeping gene selection for real time-PCR normalization in female hop (*Humulus lupulus* L) tissues. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(1).

- [Master et al., 2008] Master, E., Zheng, Y., Storms, R., Tsang, A., and Powlowski, J. (2008). A xyloglucan-specific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger* : recombinant expression, purification and characterization. *Biochemical Journal*, 411 :161–170.
- [McLauchlan et al., 1999] McLauchlan, W., Garcia-Conesa, M., Williamson, G., Roza, M., Ravestein, P., and Maat, J. (1999). A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochemical Journal*, 338(2) :441–446.
- [Micheelsen et al., 2008] Micheelsen, P., Østergaard, P., Lange, L., and Skjøt, M. (2008). High-level expression of the native barley α -amylase/subtilisin inhibitor in *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*, 133(4) :424–432.
- [Miller, 1959] Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3) :426–428.
- [Misas-Villamil and van der Hoorn, 2008] Misas-Villamil, J. and van der Hoorn, R. (2008). Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Current opinion in plant biology*, 11(4) :380–388.
- [Mitchell et al., 1997] Mitchell, D., Vogel, K., Weimann, B., Pasamontes, L., and van Loon, A. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatases : isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143(1) :245–252.
- [Monteiro et al., 2006] Monteiro, R., Becker, H., Azevedo, I., and Calhau, C. (2006). Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8) :2938–2943.
- [Monteiro et al., 2007] Monteiro, R., Faria, A., Azevedo, I., and Calhau, C. (2007). Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105(1-5) :124–130.
- [Mullineaux and Baker, 2010] Mullineaux, P. and Baker, N. (2010). Oxidative stress : antagonistic signaling for acclimation or cell death ? *Plant Physiology*, 154(2) :521–525.
- [Murakami et al., 2006a] Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M., Seigner, E., Lutz, A., and Svoboda, P. (2006a). Microsatellite DNA Analysis of Wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(8) :1553–1562.
- [Murakami et al., 2006b] Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M., Seigner, E., Lutz, A., and Svoboda, P. (2006b). Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity*, 97(1) :66–74.
- [Nadal et al., 2010] Nadal, M., Garcia-Pedrajas, M., and Gold, S. (2010). The *snf1* gene of *Ustilago maydis* acts as a dual regulator of cell wall degrading enzymes. *Phytopathology*, 100(12) :1364–1372.
- [Nagel et al., 2008] Nagel, J., Culley, L., Lu, Y., Liu, E., Matthews, P., Stevens, J., and Page, J. (2008). EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *The Plant Cell Online*, 20(1) :186–200.
- [Nalumpang et al., 2002] Nalumpang, S., Gotoh, Y., Tsuboi, H., Gomi, K., Yamamoto, H., and Akimitsu, K. (2002). Functional characterization of citrus polygalacturonase-inhibiting protein. *Journal of General Plant Pathology*, 68(2) :118–127.
- [Naqvi et al., 2005] Naqvi, S., Harper, A., Carter, C., Ren, G., Guirgis, A., York, W., and Thornburg, R. (2005). Nectarin IV, a potent endoglucanase inhibitor secreted into the nectar of ornamental tobacco plants. Isolation, cloning, and characterization. *Plant physiology*, 139(3) :1389–1400.
- [Narusaka et al., 2004] Narusaka, Y., Narusaka, M., Park, P., Kubo, Y., Hirayama, T., Seki, M., Shiraishi, T., Ishida, J., Nakashima, M., Enju, A., et al. (2004). RCH1, a locus in *Arabidopsis* that confers resistance to the hemibiotrophic fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(7) :749–762.
- [Natarajan et al., 2008] Natarajan, P., Katta, S., Andrei, I., Babu Rao Ambati, V., Leonida, M., and Haas, G. (2008). Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. *Phytomedicine*, 15(3) :194–201.

- [Neve, 1991] Neve, R. (1991). *Hops*. Chapman and Hall.
- [Niture and Pant, 2007] Niture, S. and Pant, A. (2007). Production of cell wall-degrading enzymes by a pH tolerant estuarine fungal isolate *Fusarium moniliforme* NCIM1276 in different culture conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 :1169–1177.
- [Nomine et al., 2001] Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J., and Weiss, E. (2001). A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins : application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. *Protein Engineering*, 14(4) :297–305.
- [Oliveira et al., 2010] Oliveira, M. B., Nascimento, L. B., Junior, M. L., and Petrofeza, S. (2010). Characterization of the dry bean polygalacturonase-inhibiting protein (pgip) gene family during sclerotinia sclerotiorum (sclerotiniaceae) infection. *Genetics and Molecular Research*, 9(2) :994–1004.
- [Palomares et al., 2001] Palomares, L., Pedroza, J., and Ramírez, O. (2001). Cell size as a tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system. *Biotechnology letters*, 23(5) :359–364.
- [Patzak et al., 2007] Patzak, J., Vrba, L., and Matoušek, J. (2007). New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 50(1) :15–25.
- [Pauly et al., 1999] Pauly, M., Andersen, L., Kauppinen, S., Kofod, L., York, W., Albersheim, P., and Darvill, A. (1999). A xyloglucan-specific endo- β -1, 4-glucanase from *Aspergillus aculeatus* : expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology*, 9(1) :93–100.
- [Payan et al., 2003] Payan, F., Flatman, R., Porciero, S., Williamson, G., Juge, N., and Roussel, A. (2003). Structural analysis of xylanase inhibitor protein I (XIP-I), a proteinaceous xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*, var. Soisson). *Biochemical Journal*, 372(Pt 2) :399–405.
- [Pechanova et al., 2010] Pechanova, O., Hsu, C., Adams, J., Pechan, T., Vandervelde, L., Drnevich, J., Jawdy, S., Adeli, A., Suttle, J., Lawrence, A., et al. (2010). Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. *BMC genomics*, 11(1) :674–696.
- [Peredo et al., 2009] Peredo, E., Arroyo-García, R., and Revilla, M. (2009). Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *Journal of plant physiology*, 166(10) :1101–1111.
- [Péry, 2004] Péry, F. (2004). Houblon d’alsace : que d’espoirs déçus! *L’Est agricole et viticole*.
- [Phalip et al., 2005] Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Dorsselaer, A., and Jeltsch, J. (2005). Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Current genetics*, 48(6) :366–379.
- [Phalip et al., 2009] Phalip, V., Goubet, F., Carapito, R., and Jeltsch, J. (2009). Plant cell wall degradation with a powerful *Fusarium graminearum* enzymatic arsenal. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(6) :573–581.
- [Phalip et al., 2006] Phalip, V., Hatsch, D., Laugel, B., and Jeltsch, J. (2006). An overview of fungal community diversity in diseased hop plantations. *FEMS microbiology ecology*, 56(2) :321–329.
- [Pollet et al., 2009a] Pollet, A., Beliën, T., Fierens, K., Delcour, J., and Courtin, C. (2009a). *Fusarium graminearum* xylanases show different functional stabilities, substrate specificities and inhibition sensitivities. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(4) :189–195.
- [Pollet et al., 2009b] Pollet, A., Sansen, S., Raedschelders, G., Gebruers, K., Rabijns, A., Delcour, J., and Courtin, C. (2009b). Identification of structural determinants for inhibition strength and specificity of wheat xylanase inhibitors TAXI-IA and TAXI-IIA. *FEBS Journal*, 276(14) :3916–3927.
- [Powlowski et al., 2009] Powlowski, J., Mahajan, S., Schapira, M., and Master, E. R. (2009). Substrate recognition and hydrolysis by a fungal xyloglucan-specific family 12 hydrolase. *Carbohydrate Research*, 344(10) :1175–1179.
- [Prohens et al., 2003] Prohens, J., Anderson, G. J., Rodriguez-Burruezo, A., and Nuez, F. (2003). Exploiting wild species for the genetic improvement of the pepino (*Solanum muricatum*). *Journal of Applied Botany*, 77 :21–27.

- [Protsenko et al., 2008] Protsenko, M., Buza, N., Krinitsyna, A., Bulantseva, E., and Korableva, N. (2008). Polygalacturonase-inhibiting protein is a structural component of plant cell wall. *Biochemistry (Moscow)*, 73(10) :1053–1062.
- [Qin, 2003] Qin, Q. (2003). *Discovery and characterization of a class of fungal endoglucanase inhibitor proteins from higher plants*. PhD thesis, University of Georgia.
- [Qin et al., 2003] Qin, Q., Bergmann, C., Rose, J., Saladie, M., Kolli, V., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W. (2003). Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *The Plant Journal*, 34(3) :327–338.
- [Radisek et al., 2009] Radisek, S., Leskosek, G., Jakse, J., and Javornik, B. (2009). Occurrence of *Cercospora cantuariensis* on hop in Austria and Slovenia. *Plant Pathology*, 58(2) :400–.
- [Raedschelders et al., 2005] Raedschelders, G., Fierens, K., Sansen, S., Rombouts, S., Gebruers, K., Robben, J., Rabijns, A., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Van Campenhout, S., and Volckaert, G. (2005). Molecular identification of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-II and the determinants of its inhibition specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(2) :512–522.
- [Raven et al., 2005] Raven, P., Evert, R., and Eichhorn, S. (2005). *Biology of plants*. WH Freeman.
- [Revilla et al., 2009] Revilla, P., Butrón, A., Rodríguez, V. M., Malvar, R. A., and Ordás, A. (2009). Identification of genes related to germination in aged maize seed by screening natural variability. *Journal of Experimental Botany*, 60(14) :4151–4157.
- [Samson et al., 2000] Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Filtenborg, O., and voor Schimmelcultures, C. (2000). *Introduction to food-and airborne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht.
- [Sandgren et al., 2003a] Sandgren, M., Gualfetti, P., Paech, C., Paech, S., Shaw, A., Gross, L., Saldajeno, M., Berglund, G., Jones, T., and Mitchinson, C. (2003a). The *Humicola grisea* Cel12A enzyme structure at 1.2 Å resolution and the impact of its free cysteine residues on thermal stability. *Protein science*, 12(12) :2782–2793.
- [Sandgren et al., 2003b] Sandgren, M., Gualfetti, P., Shaw, A., Gross, L., Saldajeno, M., Day, A., Jones, T., and Mitchinson, C. (2003b). Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. *Protein science*, 12(4) :848–860.
- [Sansen et al., 2004] Sansen, S., De Ranter, C. J., Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M., Delcour, J. A., and Rabijns, A. (2004). Structural basis for inhibition of *Aspergillus niger* xylanase by *Triticum aestivum* xylanase inhibitor-I. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34) :36022–36028.
- [Satoh and Fujii, 1988] Satoh, S. and Fujii, T. (1988). Purification of GP57, and auxin-regulated extracellular glycoprotein of carrots, and its immunocytochemical localization in dermal tissues. *Planta*, 175 :364–373.
- [Satoh et al., 1992] Satoh, S., Sturm, A., Fujii, T., and Chrispeels, M. J. (1992). cDNA cloning of an extracellular dermal glycoprotein of carrot and its expression in response to wounding. *Planta*, 188 :432–438.
- [Scarafoni et al., 2010] Scarafoni, A., Ronchi, A., and Duranti, M. (2010). γ -Conglutin, the *Lupinus albus* XEGIP-like protein, whose expression is elicited by chitosan, lacks of the typical inhibitory activity against GH12 endo-glucanases. *Phytochemistry*, 71(2-3) :142–148.
- [Schrödinger, 2010] Schrödinger, L. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- [Sels et al., 2008] Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B., Cammue, B., and De Bolle, M. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins : a focus on PR peptides. *Plant physiology and biochemistry*, 46(11) :941–950.
- [Shang et al., 2005] Shang, C., Sassa, H., and Hirano, H. (2005). The role of glycosylation in the function of a 48-kda glycoprotein from carrot. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(1) :144–149.
- [Shang et al., 2004] Shang, C., Shibahara, T., Hanada, K., Iwafune, Y., and Hirano, H. (2004). Mass spectrometric analysis of posttranslational modifications of a carrot extracellular glycoprotein. *Biochemistry*, 43(20) :6281–6292.

- [Shental-Bechor and Levy, 2008] Shental-Bechor, D. and Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding : a close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(24) :8256–8261.
- [Singh and Panda, 2005] Singh, S. and Panda, A. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4) :303–310.
- [Sipos et al., 2010] Sipos, B., Kreuger, E., Svensson, S., Réczey, K., Björnsson, L., and Zacchi, G. (2010). Steam pretreatment of dry and ensiled industrial hemp for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 34 :1721–1731.
- [Stotz et al., 2009] Stotz, H., Thomson, J., and Wang, Y. (2009). Plant defensins : Defense, development and application. *Plant Signaling and Behavior*, 4(11) :1010.
- [Stratilová et al., 2010] Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Rehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Rehulková, H., and Farkas, V. (2010). Xyloglucan endotransglycosylases (XETs) from germinating nasturtium (*Tropaeolum majus*) seeds : Isolation and characterization of the major form. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(4) :207–215.
- [Strese et al., 2010] Strese, E., Karsvall, O., and Tollin, C. (2010). Inventory methods for finding historically cultivated hop (*Humulus lupulus* L.) in Sweden. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(2) :219–227.
- [Sunga et al., 2008] Sunga, A. J., Tolstorukov, I., and Cregg, J. M. (2008). Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 8(6) :870–876.
- [Tahir et al., 2002] Tahir, T. A., Berrin, J. G., Flatman, R., Roussel, A., Roepstorff, P., Williamson, G., and Juge, N. (2002). Specific characterization of substrate and inhibitor binding sites of a glycosyl hydrolase family 11 xylanase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46) :44035–44043.
- [Taiz and Zeiger, 2002a] Taiz, L. and Zeiger, E. (2002a). Cell walls :structure, biogenesis, and expansion. In *Plant Physiology*, 3rd edition. Sinauer Associates.
- [Taiz and Zeiger, 2002b] Taiz, L. and Zeiger, E. (2002b). Plant cells. In *Plant Physiology*, 3rd edition. Sinauer Associates.
- [Takahashi-Ando et al., 2007] Takahashi-Ando, N., Inaba, M., Ohsato, S., Igawa, T., Usami, R., and Kimura, M. (2007). Identification of multiple highly similar XIP-type xylanase inhibitor genes in hexaploid. *Biochemical and biophysical research communications*, 360(4) :880–884.
- [Tessier et al., 1991] Tessier, D., Thomas, D., Khouri, H., Laliberié, F., and Vernet, T. (1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*, 98(2) :177–183.
- [Thomé, 1905] Thomé, O. W. (1905). *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Zeitschitz Verlag, Gera.
- [Tokunaga et al., 2008] Tokunaga, T., Miyata, Y., Fujikawa, Y., and Esaka, M. (2008). RNAi-mediated knockdown of the XIP-type endoxylanase inhibitor gene, OsXIP, has no effect on grain development and germination in rice. *Plant and Cell Physiology*, 49(7) :1122–1127.
- [Trouve et al., 1997] Trouve, C., Ledee, S., Ferran, A., and Brun, J. (1997). Biological control of the damson-hop aphid, *Phorodon humuli* (Hom. : Aphididae), using the ladybeetle *Harmonia axyridis* (Col. : Coccinellidae). *BioControl*, 42(1) :57–62.
- [Tzima et al., 2011] Tzima, A., Paplomatas, E., Rauyaree, P., Ospina-Giraldo, M., and Kang, S. (2011). VdSNF1, the sucrose non-fermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell wall degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(1) :129–142.
- [Van Cleemput et al., 2009] Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., and Heyerick, A. (2009). Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *Journal of natural products*, 72(6) :1220–1230.
- [Vandermarliere et al., 2010] Vandermarliere, E., Lammens, W., Schoepe, J., Rombouts, S., Fierens, E., Gebruers, K., Volckaert, G., Rabijns, A., Delcour, J., Strelkov, S., et al. (2010). Crystal structure of the noncompetitive xylanase inhibitor TLXI, member of the small thaumatin-like protein family. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(10) :2391–2394.

- [Vasconcelos et al., 2011] Vasconcelos, E. A. R., Santana, C. G., Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Silva, M. S., Moreira, L. R. S., Oliveira-Neto, O. B., Price, D., Fitches, E., Filho, E. X. F., et al. (2011). A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination. *BMC biotechnology*, 11(1) :14–22.
- [Verica et al., 2004] Verica, J. A., Maximova, S. N., Strem, M. D., Carlson, J. E., Bailey, B. A., and Guiltinan, M. J. (2004). Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Reports*, 23(6) :404–413.
- [Viennot-Bourgin and Heim, 1949] Viennot-Bourgin, G. and Heim, R. (1949). *Les champignons parasites des plantes cultivées*, volume 1. Masson.
- [Vincentelli et al., 2004] Vincentelli, R., Canaan, S., Campanacci, V., Valencia, C., Maurin, D., Frassinetti, F., Scappucini-Calvo, L., Bourne, Y., Cambillau, C., and Bignon, C. (2004). High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Science*, 13(10) :2782–2792.
- [Vorwerk et al., 2004] Vorwerk, S., Somerville, S., and Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9(4) :203–209.
- [Vostřel, 2010] Vostřel, J. (2010). Bifenazate, a prospective acaricide for spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) control in Czech hops. *Plant Protection Science*, 46(3) :135–138.
- [Wang et al., 2003] Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R., and Zhang, Y. (2003). mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Molecular Cell*, 12(2) :475–487.
- [Watts, 2007] Watts, D. (2007). *Dictionary of Plant Lore*. Elsevier.
- [Weichel and Nauen, 2003] Weichel, L. and Nauen, R. (2003). Monitoring of insecticide resistance in damson hop aphid, *Phorodon humuli* Schrank (Hemiptera : Aphididae) from German hop gardens. *Pest management science*, 59(9) :991–998.
- [Weihrauch, 2005] Weihrauch, F. (2005). Evaluation of a damage threshold for two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae), in hop culture. *Annals of Applied Biology*, 146(4) :501–509.
- [Weiss, 2009a] Weiss, O. (2009a). Les planteurs contraints à l’arrachage. *Dernières Nouvelles d’Alsace*, (39).
- [Weiss, 2009b] Weiss, O. (2009b). Menaces sur le Strisselspalt. *Dernières Nouvelles d’Alsace*.
- [Weiss, 2010] Weiss, O. (2010). Houblon : restructuration à marche forcée. *Dernières Nouvelles d’Alsace*.
- [Weng et al., 2010] Weng, X., Huang, Y., Gao, H., and Sun, J. (2010). Characterization of a xylanase inhibitor TAXI-I from wheat. *Biologia Plantarum*, 54(1) :154–158.
- [Wong et al., 2011] Wong, P., Walter, M., Lee, W., Mannhaupt, G., Münsterkötter, M., Mewes, H., Adam, G., and Güldener, U. (2011). FGDB : revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Research*, 39 :637–639.
- [Xi et al., 2006] Xi, J., Wang, X., Li, S., Zhou, X., Yue, L., Fan, J., and Hao, D. (2006). Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. *Phytochemistry*, 67(21) :2341–2348.
- [Xie et al., 2008] Xie, W., Hao, L., and Goodwin, P. H. (2008). Role of a xyloglucan-specific endo- β -1, 4-glucanase inhibitor in the interactions of *Nicotiana benthamiana* with *Colletotrichum destructivum*, *C. orbiculare* or *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Molecular plant pathology*, 9(2) :191–202.
- [Xu et al., 2008] Xu, Y., Yasin, A., Wucherpennig, T., and Chou, C. (2008). Enhancing functional expression of heterologous lipase in the periplasm of *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12) :2827–2835.
- [Yamaguchi et al., 2009] Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K., and Ono, M. (2009). In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine*, 16(4) :369–376.

- [Yeats et al., 2010] Yeats, T. H., Howe, K. J., Matas, A. J., Buda, G. J., Thannhauser, T. W., and Rose, J. K. C. (2010). Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *Journal of experimental botany*, 61(13) :3759–3772.
- [Yon-Kahn and Herve, 2005] Yon-Kahn, J. and Herve, G. (2005). *Enzymologie moléculaire et cellulaire, Tome 2*. EDP Sciences.
- [York et al., 2004] York, W., Qin, Q., and Rose, J. (2004). Proteinaceous inhibitors of endo- β -glucanases. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1696(2) :223–233.
- [Yoshizawa et al., 2011] Yoshizawa, T., Shimizu, T., Yamabe, M., Taichi, M., Nishiuchi, Y., Shichijo, N., Unzai, S., Hirano, H., Sato, M., and Hashimoto, H. (2011). Crystal structure of basic 7s globulin, a xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- β -glucanase. *FEBS Journal*, 278(1944–1954).