

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE VENAM

Année 2012

Etude et caractérisation des mécanismes de résistance de
Brassica napus (colza, *Brassicaceae*) vis-à-vis de la plante
parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (*Orobanchaceae*).

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences agronomiques et écologiques
Spécialité : Biologie des organismes

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Mathieu GAUTHIER

Le 26 Octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Président du Jury	Régine DELOURME, Directeur de recherches, INRA de Rennes
Rapporteurs	Thierry ROUXEL, Directeur de recherches, INRA de Paris-Grignon Alain SARNIGUET, Directeur de recherches, INRA de Rennes
Examineurs	Xavier PINOCHET, Directeur scientifique, CETIOM Philippe DELAVault, Professeur, Université de Nantes Christophe VERONESI, Maître de conférences, Université de Nantes

Directeur de thèse : M. Philippe DELAVault

Co-directeur de thèse : M. Christophe VERONESI

Sommaire

AVANT-PROPOS	5
CHAPITRE 1 - Etude Bibliographique	8
1. Introduction Générale	10
1.1. Intérêts et enjeux commerciaux de la culture du colza	10
1.1.1. Un peu d'histoire ...	10
1.1.2. Valorisation de la culture du colza	12
1.1.3. La culture du colza en France	14
1.1.4. La culture du colza en Europe	16
1.1.5. La culture du colza dans le monde	16
1.2. Les plantes parasites	18
1.2.1. Définition du parasitisme végétal	18
1.2.2. Les orobanches	24
1.2.3. Cycle de développement de l'orobanche	24
1.2.3.1. Aspect général de l'orobanche	24
1.2.3.2. La graine d'orobanche	26
1.2.3.3. Le conditionnement	28
1.2.3.4. La germination	28
1.2.3.5. Contact et fixation sur la racine de l'hôte	30
1.2.3.6. Connexion du parasite aux tissus vasculaires de l'hôte	32
1.2.3.7. Développement souterrain et émergence du parasite	33
1.2.3.8. Impact sur la culture	34
1.2.3.9. Diversité génétique de l'orobanche rameuse	35
1.3. Enjeu économique	37
2. Etude de l'interaction <i>P. ramosa</i> / <i>B. napus</i> et développement de méthodes de lutte contre l'orobanche	38
2.1. Quelques définitions et concepts	38
2.2. Gestion des plantes parasites	39
2.2.1. Les techniques culturales	39
2.2.2. Maîtrise des adventices, de la quantité de semences dans le sol et diagnostic du taux d'infestation des lots de semences	40
2.2.3. Lutte chimique	42
2.2.4. Lutte biologique	43
2.2.5. Les sources de résistance	46
2.2.5.1. Les mécanismes de résistance connus	48
2.2.5.1.1. La germination	48
2.2.5.1.2. Les mécanismes de résistance durant la fixation du parasite	50
2.2.5.1.3. La résistance face aux parasites fixés	54
2.2.5.2. L'existence de gènes majeurs de la résistance	56
2.2.5.3. Aspects transcriptomiques et protéomiques de la résistance	57
2.2.5.4. L'apport des biotechnologies dans la lutte contre les plantes parasites	59
2.2.5.5. Développement d'une lutte intégrée contre les plantes parasites	60
3. Objectifs de la thèse	61

CHAPITRE 2 - Etude du comportement de géotypes de colza vis-à-vis de <i>P. ramosa</i>	63
1. Matériel & méthodes	67
1.1. Matériel végétal	67
1.2. Co-cultures en système hydroponique en chambre de culture	67
1.3. Co-cultures en pot en serre	71
1.4. Analyses statistiques	73
2. Résultats	73
2.1. Résistance du colza et induction de la germination	73
2.2. Résistance du colza par obstacle à la fixation du parasite	74
2.3. Résistance du colza par induction d'un retard de développement	76
2.4. Expérimentations en serres	80
3. Discussion-Conclusion	81
CHAPITRE 3 - Induction de mécanismes de résistance chez le colza par des stimulateurs des défenses naturelles (SDN) : le BTH et la laminarine	88
1. Stimulation des défenses du colza par le BTH	89
1.1. Matériel et méthodes	90
1.1.1. Matériel végétal	90
1.1.1.1. Stérilisation des graines et mise en place du système de culture	90
1.1.1.2. Traitement des feuilles de <i>B. napus</i> par une solution de BTH	91
1.1.1.3. Traitement des racines de <i>B. napus</i> par une solution de BTH	91
1.1.1.4. Traitement des feuilles d' <i>A. thaliana</i> par une solution de BTH	91
1.1.1.5. Effet d'un traitement BTH sur l'interaction <i>B. napus</i> - <i>P. ramosa</i>	92
1.1.2. Analyses transcriptomiques	92
1.1.2.1. Extraction des ARN totaux pour les analyses cDNA-AFLP et PCR semi-quantitatives	92
1.1.2.2. Extraction des ARN totaux pour les analyses q-RT-PCR	93
1.1.2.3. Traitement à la DNase des ARN	93
1.1.2.4. cDNA AFLP	95
1.1.2.5. Clonage des ADNc	100
1.1.2.6. RT-PCR quantitatives en temps réel, q-RT-PCR	100
1.1.2.7. RT-PCR semi-quantitatives	102
1.2. Résultats-discussion	102
1.2.1. Approche non ciblée (cDNA-AFLP)	102
1.2.2. Approche ciblée	108
1.2.2.1. Effet d'un traitement BTH au niveau des feuilles sur le transcriptome des racines de colza	108
1.2.2.2. Effet d'un traitement BTH au niveau des feuilles sur le transcriptome d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	110
1.2.2.3. Effet d'un traitement BTH sur les racines de colza	110
1.3. Conclusion	112
2. Effet de la laminarine	113

2.1. Matériel et méthodes	114
2.1.1. Culture en pots du colza	114
2.1.2. Traitement laminarine	114
2.1.3. Evaluation du taux de germination des graines d'orobanche	115
2.2. Résultats	117
2.2.1. Traitement foliaire de laminarine	117
2.2.2. Traitement par lessivage du substrat	117
2.2.3. Discussion	119
CONCLUSION GENERALE	122
ANNEXES	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139
LISTE DES ILLUSTRATIONS	159
LISTE DES ABREVIATIONS	162
RESUME	164

Avant-propos

Dans le monde, il existe de nombreuses familles de plantes parasites connues pour provoquer des dégâts importants sur des cultures d'intérêt économique. En Europe, et notamment en France, c'est la nuisibilité des orobanches qui pose problème. Ces plantes parasites vivent aux dépens d'une plante hôte sur laquelle elles sont fixées pour puiser toutes les substances nutritives nécessaires à leur propre développement. Il en résulte d'importantes pertes de rendement allant jusqu'à la destruction totale de la culture parasitée. *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel, l'une des orobanches les plus nuisibles, est présente dans toute l'Europe méditerranéenne. Depuis une quinzaine d'années, les orobanches posent de sérieux problèmes en Europe et notamment en France car plusieurs espèces sont présentes sur ce territoire. Ainsi, les deux principales espèces rencontrées en France sont *Orobanche cumana* qui attaque le tournesol et *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel, l'orobanche rameuse, qui va nous intéresser plus particulièrement dans cette étude. Cette dernière est une espèce très polyphage qui attaque de nombreuses cultures françaises comme le chanvre, le tabac, le melon et le colza. Ainsi sur certaines parcelles de colza fortement infestées par cette orobanche, la production de graines peut être fortement impactée mettant ainsi en péril cette culture dans le bassin de production donné. Depuis le début de l'intensification de cette culture à partir de la seconde moitié du XXe siècle, la sélection du colza n'a jamais été orientée vers la résistance à l'orobanche. Le risque important que représente l'orobanche rameuse pour le colza et le peu d'informations relatives à la résistance de cette culture face à cette plante parasite a donc amené le LBPV (Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales) de l'Université de Nantes, l'UMR APBV de l'INRA (Amélioration des Plantes et Biotechnologie Végétales - Institut National de la Recherche Agronomique) de Rennes et le CETIOM à s'associer dans le cadre d'un programme PROMOSOL pour étudier et caractériser les mécanismes de résistance du colza vis-à-vis de *P. ramosa*. Pour parvenir à cet objectif, il fallait donc répondre à plusieurs questions concernant l'interaction colza-*P. ramosa*. Existe-t-il des génotypes de colza

résistants à l'orobanche rameuse ? Si oui, quels sont les mécanismes de résistance associés ? Si non, peut-on déclencher artificiellement des voies de défense chez le colza et utiliser celles-ci dans la lutte contre l'orobanche ? Ce travail de thèse à caractère exploratoire sur cette interaction encore méconnue s'articule donc autour de ces trois questions pour lesquelles nous avons tenté d'apporter des réponses.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

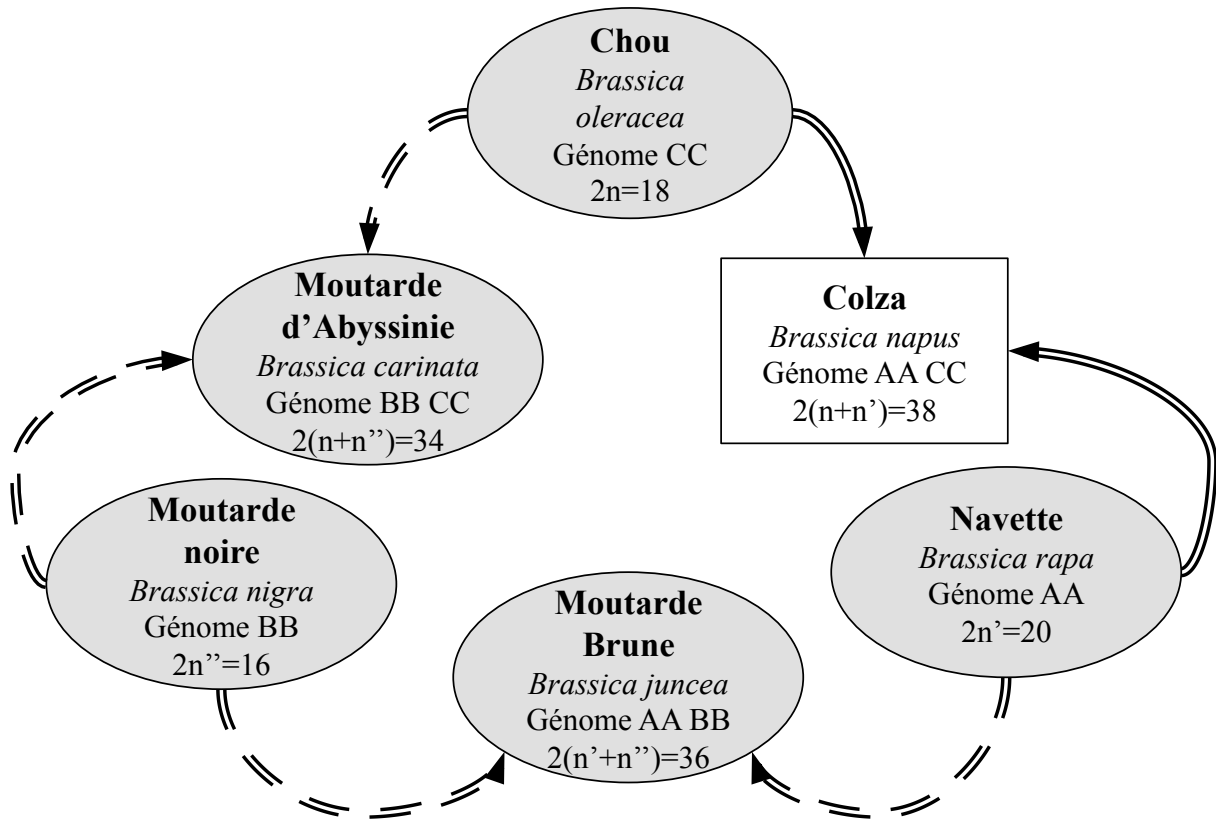


Figure 1 : Relations entre les espèces importantes de *Brassica* (U, 1935)

CHAPITRE 1 - Etude bibliographique

1. Introduction Générale

En préambule à l'étude de l'interaction *Brassica napus* – *Phelipanche ramosa*, il m'a semblé nécessaire de poser les bases de la connaissance des enjeux économiques liés à cette pathologie ainsi que d'introduire les concepts biologiques de base du parasitisme végétal, en me focalisant plus particulièrement sur les plantes parasites du genre *Orobanche*.

1.1. Intérêts et enjeux commerciaux de la culture du colza

1.1.1. Un peu d'histoire ...

Le colza, *Brassica napus* L. est une plante appartenant à la famille des Brassicacées cultivée essentiellement pour la production d'huile et de tourteaux à destination des filières alimentaires et industrielles. Le colza est issu du croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea* L. $2n = 18$) et la navette (*Brassica rapa* L. $2n = 20$) (Figure 1). Cette plante serait apparue naturellement entre -2000 et -1500 ans avant J.-C. dans les potagers où la culture du chou pour l'alimentation humaine aurait été mitoyenne de celle de la navette pratiquée dans l'antiquité pour son huile d'éclairage. Son bassin d'apparition se situerait à la confluence des zones de culture de la navette (Europe et Asie) et du chou (Europe et Afrique du Nord-Ouest) (Gallais et Bannerot, 1992). La culture proprement dite du colza daterait du XIII^e siècle en Europe et les travaux de sélection n'ont débuté qu'au début du XX^e siècle et seulement à partir de 1940 en France par l'INRA. Ces premiers travaux ont permis d'améliorer considérablement la culture du colza en termes d'augmentation du rendement, de résistance à la verse, de résistance à la nécrose du collet, et de qualité de la graine.

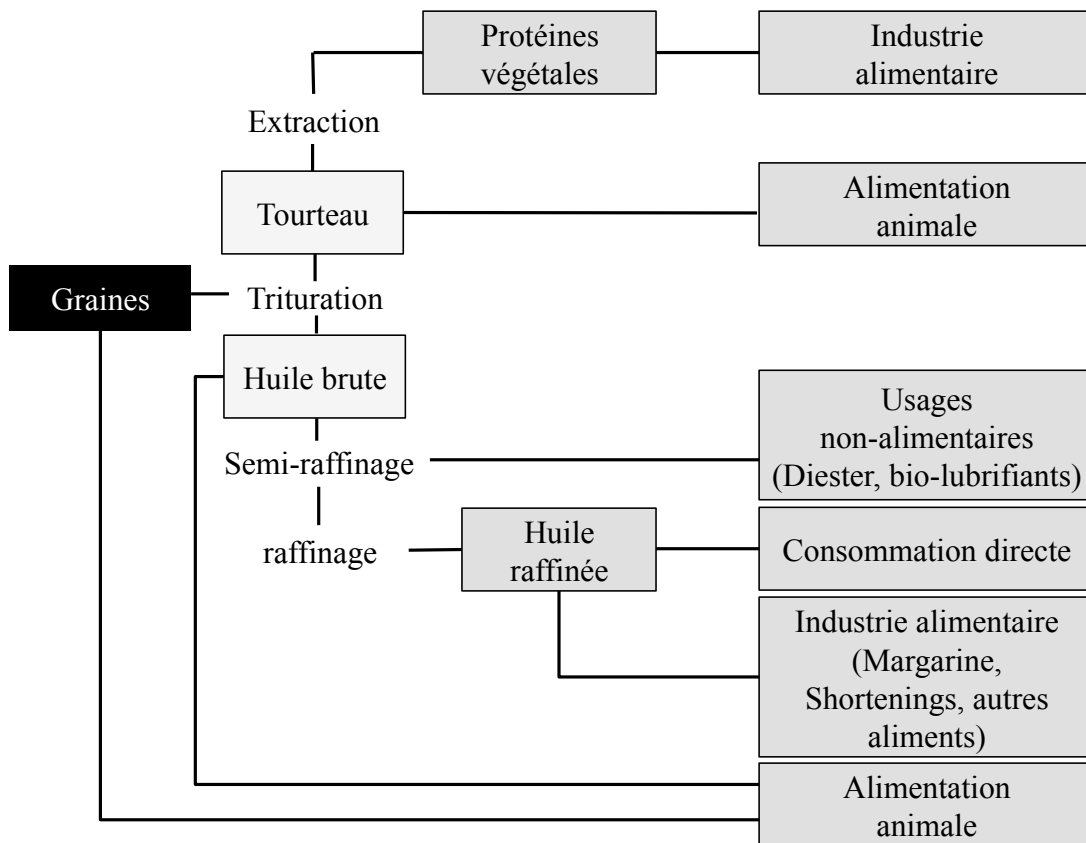


Figure 2 : Débouchés de la filière colza (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/debouches/colza-et-tournesol/debouches-alimentaires/)

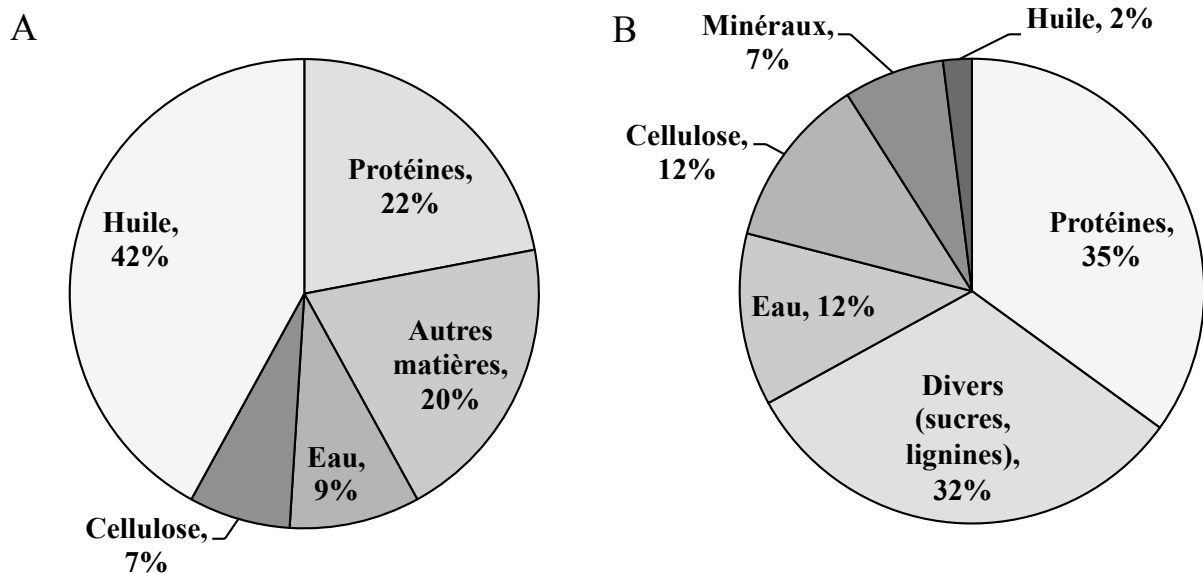


Figure 3 : Composition de la graine de colza (A) et du tourteau de colza (B) (www.prolea.com/)

1.1.2. Valorisation de la culture du colza

Les produits de transformation du colza ont de nombreux débouchés et des utilisations très variées tant dans l'industrie que l'alimentation humaine et animale (Figure 2). L'essentiel de la production du colza est à destination de la production d'huile et de tourteaux. La graine de colza est composée d'huile brute à hauteur de 40-42 % du poids de la graine. Le profil en acides gras de l'huile de colza est : 8 % d'acides gras saturés, 60 % d'acides gras monoinsaturés (dont 58 % d'acide oléique), et 32 % d'acides gras polyinsaturés dont 23 % d'acide linoléique, précurseur de la famille des acides gras oméga 6 indispensables à la vie et 9 % d'acide alpha linoléique, précurseur de la famille des acides gras oméga 3 connus, entre autres, pour leur intérêt dans la prévention des maladies cardio-vasculaires. Les 56 % de la matière restante constituent le tourteau qui est composé de 35 % de protéines (riches en lysine, acides aminés soufrés, thréonine, méthionine et cystéine), de cellulose, de minéraux, d'eau, de 2 % d'huile restant et jusqu'à 32 % de sucres et lignines (Figure 3). Les tourteaux sont majoritairement destinés à l'alimentation du bétail en tant que compléments alimentaires. Des recherches ont également été menées pour valoriser les protéines de tourteaux vers d'autres destinations que l'alimentation animale comme des substituts à la viande déjà développés dans la filière de transformation du soja.

La principale destination du colza est donc la production d'huile. Ce secteur se divise en deux débouchés distincts : la production d'huile alimentaire humaine ou animale et la production de produits non alimentaires. En ce qui concerne les débouchés non alimentaires, ceux-ci sont en premier lieu les biocarburants (diester) et en second lieu les biolubrifiants utilisés par les secteurs de l'automobile, de la métallurgie... (Tableau I page 22 ; ADEME, 2004). La fabrication du diester s'effectue par une réaction de trans-estérification de l'huile végétale par le méthanol selon la réaction : 1 t d'huile + 100 kg méthanol → 1 t de diester + 100 kg glycérine.

Tableau I : Principales applications des usages non alimentaires des huiles végétales Européennes (www.prolea.com)

	Exemples d'applications	Bases végétales
Lubrifiants et fluides hydrauliques	lubrifiants pour matériels travaillant en extérieur : chaînes de tronçonneuses, machines agricoles, engins de chantiers...	colza , tournesol oléique
	fluides hydrauliques pour engins de travaux extérieurs	tournesol oléique
	produits de décoffrage du béton	colza
	fluides pour forages pétroliers en mer	colza
	travail des métaux	esters d'huile de colza
	moteurs 2-temps	tournesol oléique
Solvants	fluxants pour bitumes	esters d'huile de tournesol
	adjuvants de produits de traitements agricoles	esters d'huile de colza
	dégraissage industriel, décapage en extérieur et en intérieur	esters d'huile de colza
Revêtements et encres	peintures et vernis	lin, soja, tournesol, colza et ricin
	encres	huiles et esters de soja, tournesol et colza
	traitement du bois	huile de lin
	linoléum	huile de lin
	résines polyuréthanes (mousses rigides)	ricin
Tensioactifs	produits cosmétiques (crèmes, rouges à lèvres...)	dérivés d'huiles de colza (dont érucique), ricin, glycérine
	savons ménagers	huile de lin
	additifs dans procédés de fabrication et de nettoyage (usinage)	dérivés d'huiles de colza dérivés d'huile de colza (dont érucique)
Plastiques	additifs stabilisants et plastifiants	dérivés d'huile de colza érucique et soja

La glycérine, produit de la réaction de la trans-estérification est aussi valorisée dans différents secteurs de l'industrie : cosmétique, pharmaceutique, alimentaire...

Les nombreux débouchés offerts par les produits du colza et de ses produits de transformation en font une culture d'importance économique majeure à de nombreux niveaux. Son importance agricole et agronomique est incontestable, et son intérêt industriel ne cesse de se développer.

1.1.3. La culture du colza en France

La culture de colza est devenue à partir du milieu des années 90 la principale culture oléagineuse en France. Aujourd'hui, avec près 1,5 millions d'hectares devant le tournesol (740 000 hectares), les surfaces de colza n'ont cessé de croître jusqu'en 2008 où elles se sont stabilisées au niveau actuel. La part du colza à destination industrielle représente environ 500 000 ha de la production française essentiellement localisée dans le Nord-Est (Figure 4 page 24). L'essor du colza depuis ces dernières années est essentiellement lié à la demande croissante en biocarburants. La production du colza a été multipliée par 8 sur les 30 dernières années : 630 000 tonnes en 1973 (Figure 5 page 24) à près de 5 300 000 tonnes pour la campagne de 2011 (AMSOL 2010-2011). Cette envolée de la production est fortement liée à l'amélioration des rendements de la culture sur les trois dernières décades en passant de 19 qx/ha à 34,3 qx/ha (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/les-oleagineux-en-chiffres). Depuis 2007 on assiste à une forte augmentation de l'activité de trituration qui consiste à extraire l'huile des graines de plantes oléagineuses (Figure 6 page 26). Cette augmentation est due aux dispositions de l'état français en matière de politique de développement des biocarburants. Devançant de près de 2 ans les décisions de l'Union Européenne, 5 % des moteurs diesels roulent au Diester. Cette hausse s'explique par la mise en place d'une prime de 45 €/ha pour la production de biocarburants sur les jachères industrielles. Cette prime s'inscrivant dans la

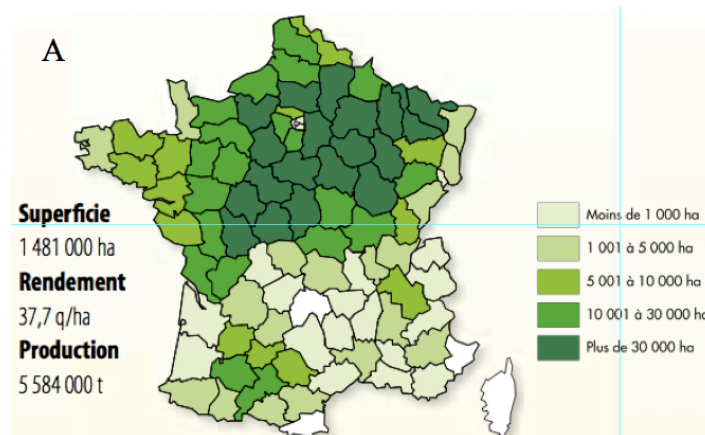


Figure 4 : Répartition de la culture du colza en France (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/les-oleagineux-en-chiffres/france/chiffres-cles-2009/) (A) colza alimentaire et industriel

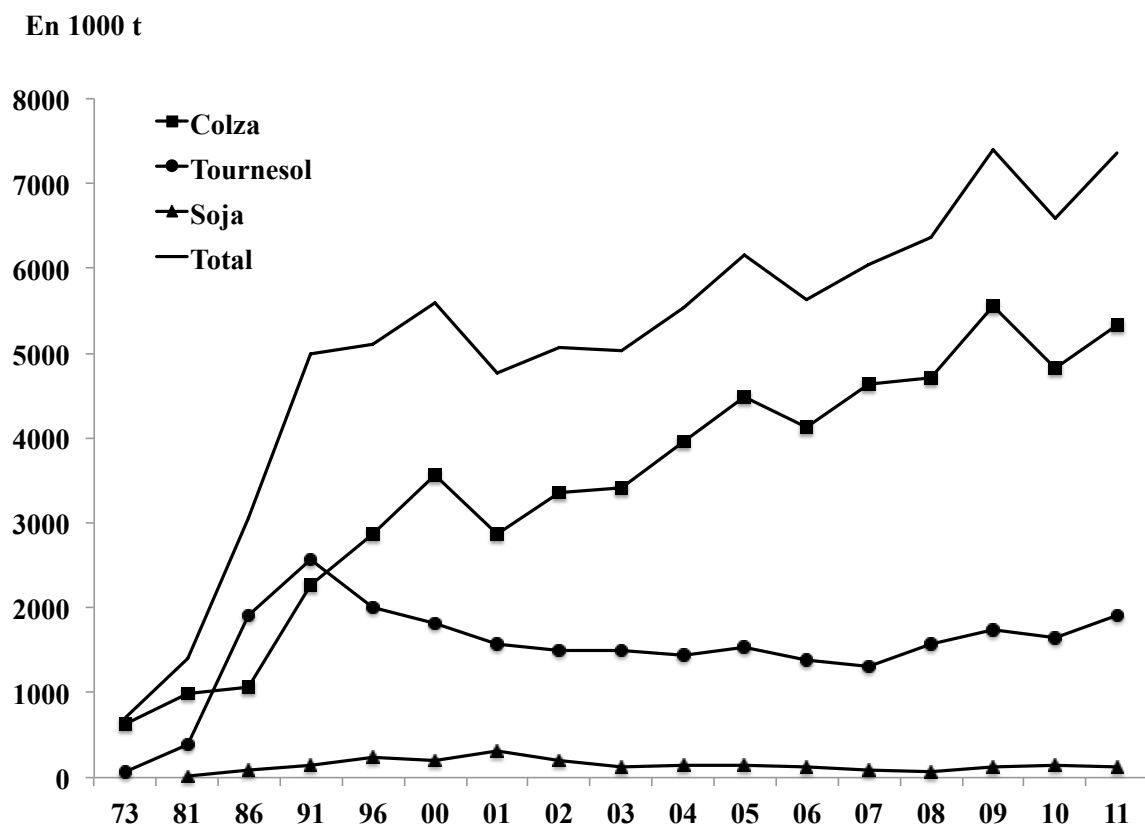


Figure 5 : Evolution de la production des 3 principales cultures oléagineuses en France entre 1973 et estimée en 2011 (En milliers de tonnes) (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/les-oleagineux-en-chiffres/france/graines-oleagineuses/production-surfaces-et-rendements/)

Politique Agricole Commune européenne (PAC) a encouragé la production de colza biocarburant.

1.1.4. La culture du colza en Europe

La situation de la culture du colza en Europe a été fortement marquée par l'adhésion de nombreux pays dans l'Union Européenne (UE) sur la dernière décennie (Figure 7 page 26). Les plus grandes surfaces de production se trouvent en France (1,48 Mha) et en Allemagne (1,47 Mha) suivi du Royaume-Uni (+ Irlande) (581 Kha) et enfin les pays d'Europe de l'est. La surface européenne de production de colza dépasse les 6 Mha en 2009. Les principaux pays producteurs sont l'Allemagne avec 6,3 Mt et la France avec 5,6 Mt en 2009 (source : www.faostat.fao.org). L'UE à 27 membres est le premier producteur de graines oléagineuses au niveau mondial avec près de 20 millions de tonnes (Figure 8 page 28).

1.1.5. La culture du colza dans le monde

Le colza est la seconde culture oléagineuse au monde et représente 15 % de la production de graine d'oléagineux (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/les-oleagineux-en-chiffres/monde/graines-oleagineuses/production/). Il n'est devancé que par le soja qui représente 54 % de la production. Cependant, c'est l'Union Européenne qui domine la production de colza avec 32 % de la production devant le Canada (22 %) et la Chine (19,7 %) (www.cetiom.fr/debouches-chiffres).

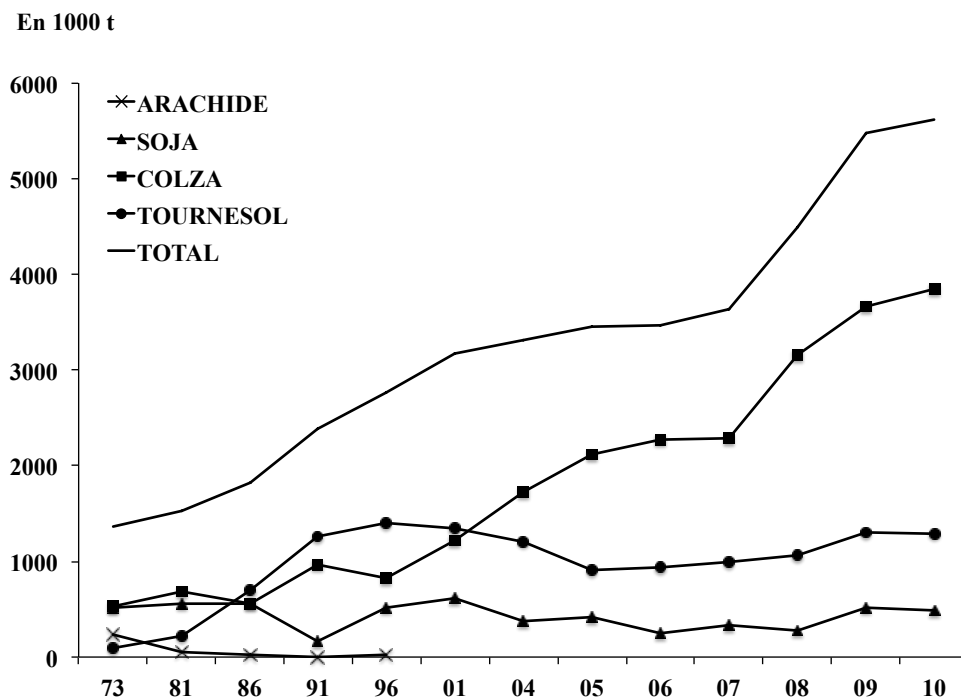


Figure 6 : Evolution de l'activité de trituration entre 1973 et 2010 en France (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/les-oleagineux-en-chiffres/france/huiles-vegetales/production/)

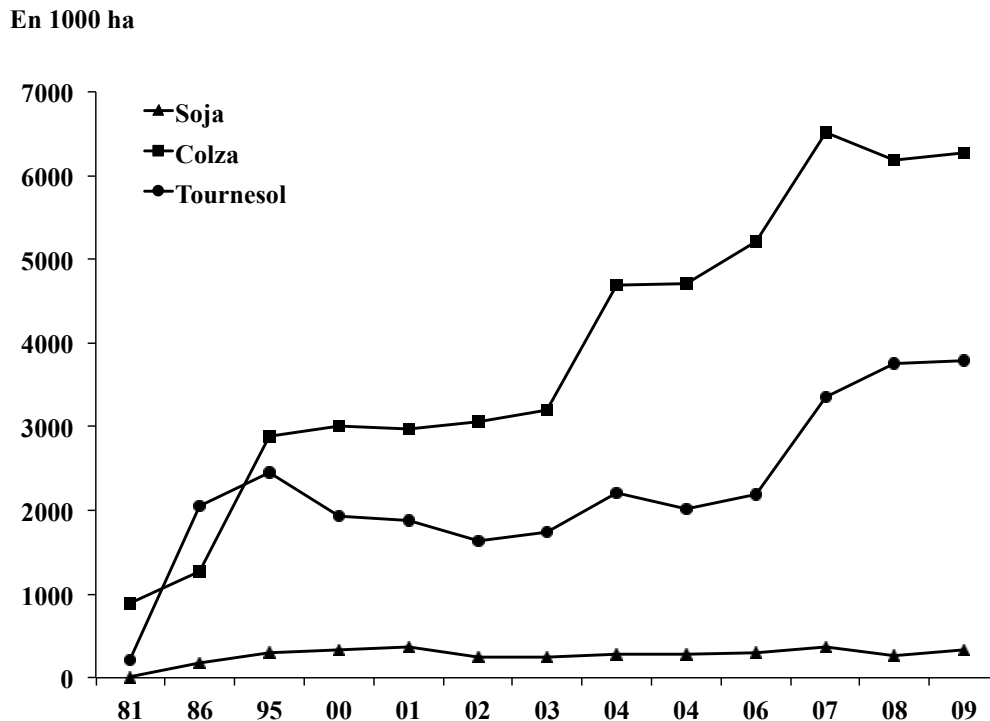


Figure 7 : Évolution des surfaces de graines oléagineuses dans l'UE (CEE à 10 en 1981, à 12 en 1986, y compris ex-RDA depuis 1990, à 15 de 1995 à 2003, à 25 depuis 2004, à 27 depuis 2007) (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/les-oleagineux-en-chiffres/europe/graines-oleagineuses/surfaces-par-pays/)

1.2. Les plantes parasites

1.2.1. Définition du parasitisme végétal

Dans la nature les interactions entre les êtres vivants végétaux ou animaux sont très courantes. Quand ces organismes vivent et se développent sur un autre organisme de manière permanente ou non et lorsqu'ils interagissent nutritionnellement il s'agit alors de symbiose au sens large. Une symbiose est dite mutualiste quand l'interaction est bénéfique pour les deux organismes qui la constituent. Dans le cas d'une symbiose parasitaire, l'interaction se déroule en sens unique, le symbionte étant le seul bénéficiaire de l'interaction (Smith et Douglas, 1987). Le parasitisme peut alors se définir comme l'état d'un organisme vivant aux dépens d'un autre appelé hôte. La symbiose qu'elle soit parasitaire ou non est largement répandue au sein des règnes des bactéries ou des champignons. Chez les végétaux supérieurs certaines espèces de plantes ont un mode de vie parasitaire : il s'agit des plantes parasites. Il est difficile de déterminer précisément leur nombre, mais il est estimé que parmi les plantes phanérogames (angiospermes et gymnospermes), 2 % d'entre elles sont des parasites ce qui représente environ 4 500 espèces réparties en une vingtaine de familles (Raynal-Roques et Paré, 1998) (Tableau II page 30).

Les plantes parasites se différencient des plantes non parasites par le fait qu'elles sont plus ou moins hétérotrophes pour le carbone et l'azote. Leur statut de plantes parasites les oblige à puiser en partie l'eau, les matières organique et minérale chez la plante hôte. Il est possible de classer les plantes parasites en quatre catégories d'une part selon leur site de fixation sur la plante hôte, et d'autre part selon la présence ou non de chlorophylle (Figure 9 page 30) :

- Les plantes parasites se fixant sur les parties aériennes de leur hôte sont qualifiées d'épiphytes (la cuscute ou le gui) tandis que celles établissant un contact avec les racines de la plante hôte sont qualifiées d'épirhizes (les strigas et les orobanches) (Figure 10 page 32).

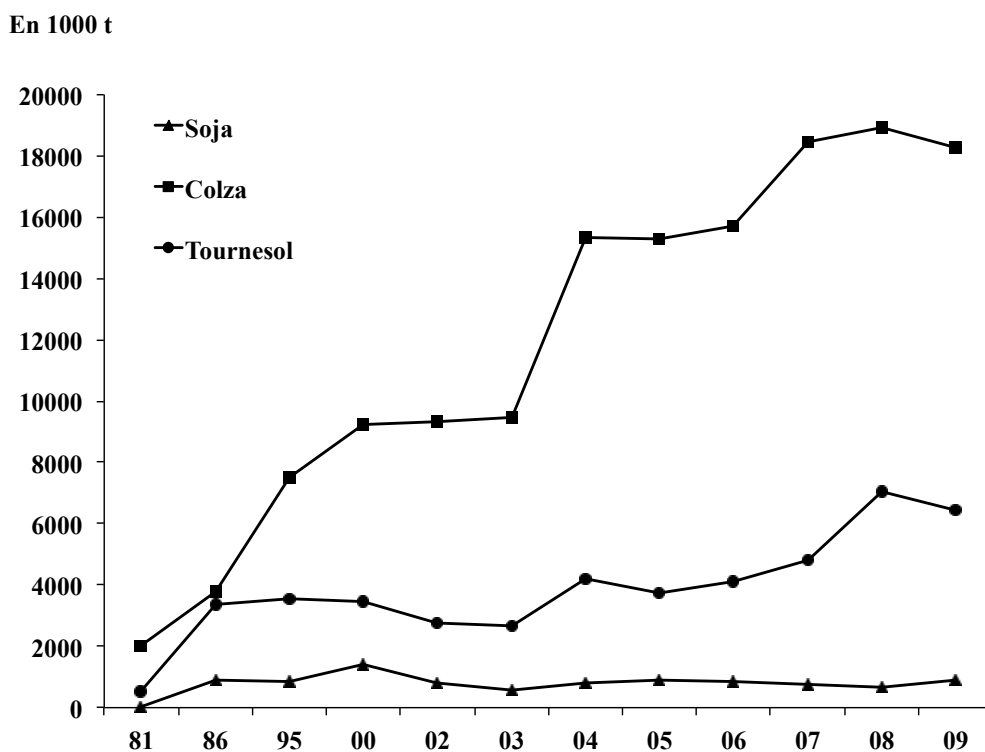


Figure 8 : Evolution de la production de graines oléagineuses dans l'UE (CEE à 10 en 1981, à 12 en 1986, y compris ex-RDA depuis 1990, UE à 15 en 1995, UE à 25 depuis 2004, UE à 27 depuis 2007.) (www.cetiom.fr/debouches-chiffres/les-oleagineux-en-chiffres/europe/graines-oleagineuses/production-par-pays/)

- Les plantes parasites ayant conservé une capacité photosynthétique comme *Striga* (épirhize) ou le gui (épiphyte) sont définies comme hémiparasites et possèdent donc de la chlorophylle tandis que les plantes dépourvues de chlorophylle et ayant perdu alors toute capacité photosynthétique sont qualifiées d'holoparasites telles que les orobanches (épirhizes) et les cuscutes (épiphytes) (Figure 10 page 32).

Les plantes parasites se connectent à leur hôte grâce à une structure, l'haustorium, sorte de suçoir établissant un pont physiologique et morphologique entre les deux partenaires (Kuijt, 1977). Les hémiparasites sont connectées essentiellement à leur hôte par l'intermédiaire des vaisseaux du xylème transportant la sève brute composée d'eau et de sels minéraux (Dörr, 1997). La plante parasite réalise alors elle-même sa photosynthèse à l'aide des éléments qu'elle aura prélevés sur son hôte afin de produire les éléments nutritifs indispensables à son développement. Les holoparasites quant-à-elles, incapables de réaliser la photosynthèse sont connectées en grande partie aux vaisseaux du phloème de l'hôte (Hibberd *et al.*, 1999). Elles détournent alors les substances nutritives issues de la photosynthèse de l'hôte pour leur propre profit. Les holoparasites et quelques hémiparasites sont des parasites obligatoires. D'autres sont capables de se développer en l'absence de leur hôte, ces plantes parasites facultatives comme *Triphysaria* et *Rhinantus* (Figure 10 page 32) possèdent en effet des racines fonctionnelles capables de prélever les nutriments du sol (Seel et Jeschke, 1999). Ces plantes sont cependant assez rares dans la nature (Musselmann et Press, 1995).

Dans la majorité des cas le parasitisme végétal n'est pas considéré comme une problématique agronomique mais plutôt comme une curiosité botanique comme par exemple *Rafflesia* (Figure 10 page 32) qui est une plante holoparasite possédant la plus grande fleur au monde et qui est pollinisée par des mouches attirées par l'odeur de viande en décomposition dégagée par la fleur. Cependant, d'un point de vue agro-économique, le parasitisme végétal

Tableau II : Familles et espèces de plantes parasites chez les phanérogames

Famille	Genre	Espèces	Famille	Genre	Espèces
OLACACEAE	14	104	RAFFLESIACEAE	3	20
SCHOEPFIACEAE	1	25	CYTINACEAE	2	7
MISODENDRACEAE	1	10	APODANTHACEAE	3	23
LORANTHACEAE	73	905	MITRSTEMONACEAE	1	2
OPILIACEAE	11	34	LAURACEAE	1	16
SANTALACEAE	39	556	KRAMERIACEAE	1	18
VISCACEAE	7	546	LENNOACEAE	2	5
BALANOPHORACEAE	17	43	CONVOLVULACEAE	1	145
CYNOMORIACEAE	1	2	OROBANCHACEAE	89	2062
HYDNORACEAE	2	15		19	4538

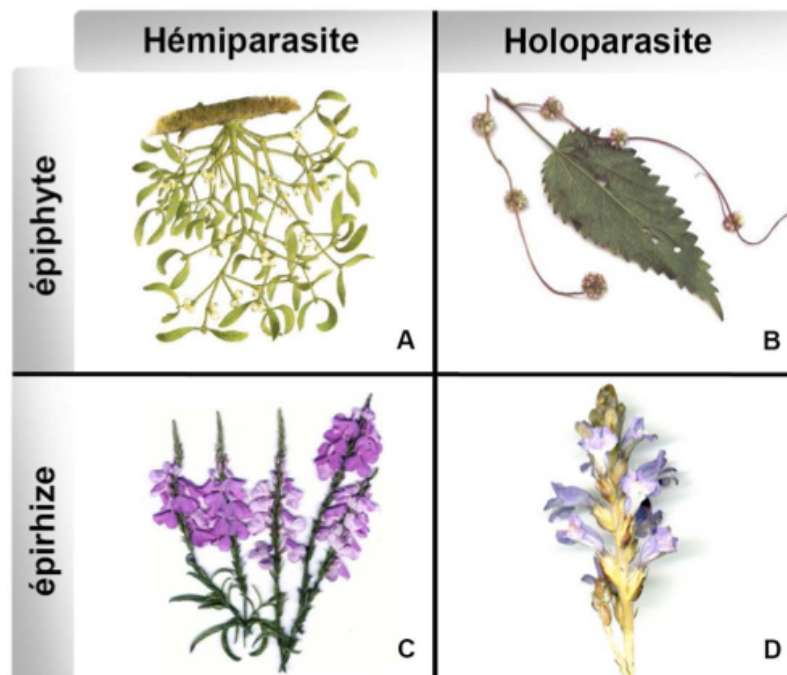


Figure 9 : Différents types de parasitisme chez les plantes (Péron, 2010).

(A) illustration du gui (*Viscum album*), (B) illustration de la cuscute de l'ortie (*Cuscuta europaea*), (C) illustration d'hampes florales de striga (*Striga hermonthica*), (D) illustration d'une hampe florale d'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa*).

peut dans certains cas constituer un fléau pour les cultures d'intérêt économique. Ce parasitisme végétal doit alors être considéré comme une pathologie végétale, d'un point de vue anthropocentrique, quand celui-ci impacte sur des plantes cultivées. En France l'on voit se développer *Phelipanche ramosa* sur colza et *Orobanche cumana* sur tournesol (Figure 10 page 32), deux espèces agronomiques à très fortes valeurs marchandes. A l'inverse, de manière endémique, il n'est pas rare d'observer *Orobanche hedereae* sur le lierre... sans valeur économique.

Sur le plan mondial, les plantes parasites doivent être considérées comme de redoutables bioagresseur des plantes cultivées. En Afrique, *Striga hermontica* (Figure 10 page 32) provoque de sévères dégâts sur les cultures vivrières de maïs, millet et sorgho conduisant à de faibles récoltes pour les agriculteurs (Parker et Riches, 1993). Cinquante millions d'hectares de céréales et légumineuses sont ainsi contaminés par *Striga* en Afrique subsaharienne (Ejeta, 2007). *Viscum album*, le gui (Figure 10 page 32), induit des pertes dans l'industrie du bois. En effet, en plus d'affaiblir l'arbre en prélevant la sève, au niveau du point d'implantation du gui, le bois acquiert une structure qui le rend inexploitable comme bois d'œuvre. Inversement, certaines plantes parasites peuvent présenter malgré tout un intérêt économique. On peut citer de nouveau le gui qui est employé dans le secteur médical dans le développement de traitement contre le cancer (Strüh *et al.*, 2012). Le sental, *Santalum album*, appartenant à la famille des *Santalaceae*, est un arbre hémiparasite cultivé pour son bois : le bois de santal. Ce bois est utilisé pour la production d'huiles essentielles (Radomiljac *et al.*, 1999), d'objets d'arts (statuettes...) (Figure 10 page 32).

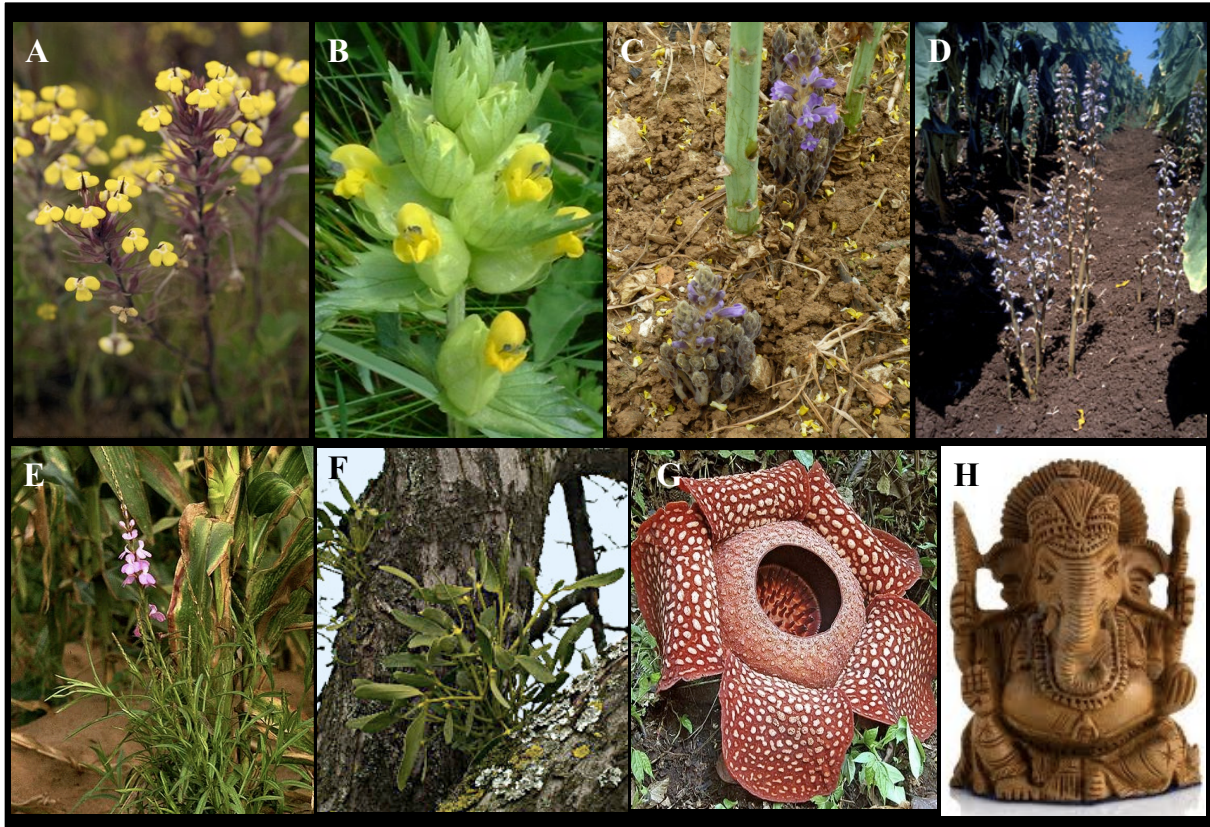


Figure 10 : Exemples de plantes parasites les plus connues.

(A) *Triphysaria versicolor*, (B) *Rhinantus minor*, (C) *Phelipanche ramosa* sur pied de tournesol, (D) *Orobanche cumana* sur tournesol, (E) *Striga hermonthica*, (F) *Viscum album*, le gui, (G) *Rafflesia arnoldii*, (H) Statuette du Dieu Hindou Ganesh en bois de santal.

1.2.2. Les orobanches

Les orobanches sont les espèces les plus représentées parmi les *Orobanchaceae*. Sur les 170 espèces d'orobanches une vingtaine seulement sont considérées comme des mauvaises herbes, du fait de leur impact sur des cultures d'intérêt et sur l'activité humaine en découlant (Schneeweiss *et al.*, 2004), et sept sont particulièrement étudiées en raison de la gravité des dommages qu'elles occasionnent. Ainsi seize millions d'hectares de cultures sont estimés être contaminés par *Orobanche* spp. (Parker, 2009). Ces orobanches sont en particulier *O. cumana* Wallr., *P. aegyptiaca* Pers., *O. cernua* Loefl., *O. minor* Sm., *O. crenata* Forsk., *O. foetida* Poir., et *P. ramosa* (L.) Pomel. La distribution géographique des orobanches est essentiellement méditerranéenne mais tend à envahir de nouveaux espaces en partie à cause de l'activité humaine (Joel *et al.*, 2007). Les orobanches ont une gamme d'hôtes en général large et occasionnent des dégâts sur de très nombreuses cultures d'intérêts (Tableau III page 34).

1.2.3. Cycle de développement de l'orobanche

1.2.3.1. Aspect général de l'orobanche

L'orobanche est une plante holoparasite épirhize dépourvue de racines développées et fonctionnelles. De par sa nature, le développement de cette plante revêt plusieurs particularités. En effet, du fait de l'absence de chlorophylle, elle n'est pas apte à réaliser le processus photosynthétique et est donc hétérotrophe. La morphologie de l'orobanche est bien différente de la morphologie des plantes « classiques » autotrophes. Dans le cas de l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa*), celle-ci se présente sous la forme d'une tige de 10 à 30 cm le plus souvent ramifiée (Figure 11 page 36). Les feuilles réduites à de simples écailles sont nombreuses et mesurent environ 1 cm de long. Les fleurs regroupées en épi lâche ont une grande variabilité de coloration, s'étalant du jaune pâle orné de bleu-violet à du bleu-

Tableau III : Principales espèces d'orobanches pathogènes de cultures d'intérêts et leurs hôtes. (Kasasian, 1971 ; Pieterse, 1979 ; Musselman, 1980 ; Foy *et al.*, 1989 ; Linke *et al.*, 1989)

NOM LATIN	NOM FRANCAIS	<i>P. ramosa</i>	<i>O. minor</i>	<i>O. foetida</i>	<i>O. cumana</i>	<i>O. crenata</i>	<i>O. cernua</i>	<i>P. Egyptiaca</i>
ASTERACEAE								
<i>Lactuca spp.</i>	Laitue	X	X					X
<i>Helianthus annuus L.</i>	Tournesol	X			X	X	X	X
SOLANACEAE								
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	X			X	X	X	X
<i>Nicotiana tabacum L.</i>	Tabac	X	X		X		X	X
<i>Solanum melongena L.</i>	Aubergine	X			X		X	X
<i>Solanum tuberosum L.</i>	Pomme de terre	X						X
FABACEAE								
<i>Trifolium spp.</i>	Trèfle		X					X
<i>cicer arietinum L.</i>	Pois chiche					X		X
<i>Pisum sativum L.</i>	Petit pois					X		
<i>Lens culinaris Medik</i>	Lentille	X	X			X		X
<i>Vicia faba L.</i>	Fève		X			X		X
<i>Vicia spp.</i>	Vesces					X		X
<i>Medicago sativa L.</i>	Luzerne cultivée		X	X				
<i>Medicago spp.</i>	Luzernes		X					
<i>Arachis hypogea L.</i>	Arachide	X						X
<i>Lotus spp.</i>	Lotiers		X	X				
APIACEAE								
<i>Apium spp.</i>	Céleri	X				X		X
<i>Daucus carota L.</i>	Carotte	X				X		X
CANNABINACEAE								
<i>Canabis sativa L.</i>	Chanvre cultivé	X						X
CUCURBITACEAE								
<i>Cucumis sp.</i>	Melon / Concombre	X						X
<i>Cucurbita spp.</i>	Courges							X
BRASSICACEAE								
<i>Brassica sp.</i>	Colza / moutarde	X						
MALVACEAE								
<i>Gossypium hirsutum L.</i>	Cotonnier	X						

violet soutenu. Le calice est court présentant 4 à 5 dents avec à la base deux pré-feuilles. La corolle quant à elle mesure 10 mm à 20 mm de long et présente des filets staminaux soudés sur 3 mm à 5 mm (Habashi et Jeanmonod, 2008).

1.2.3.2. La graine d'orobanche

Le fruit de l'orobanche, la capsule, peut contenir de 500 à 5000 graines. Il est estimé qu'un plant d'orobanche peut produire entre 50 000 et 500 000 graines. Les graines d'orobanche sont extrêmement petites (200 μm à 300 μm) et pèsent entre 4 μg et 9 μg . Celles-ci sont facilement dispersées par le vent, l'eau, les machines agricoles (Mesa- García *et al.*, 1986) et les animaux (Jacobsohn *et al.*, 1987), mais aussi sur de longues distances via des lots de semences contaminés (Castejón-Muñoz *et al.*, 1991). Chez *O. crenata* Forsk., des observations en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et en Microscopie Electronique à Transmission (MET) montrent que la graine est constituée d'un embryon entouré d'un albumen très réduit (1 à 2 assises cellulaires) ceinturé d'un tégument séminal. Ce tégument séminal est ornementé, ce qui donne à la graine son relief caractéristique. Cette ornementation se forme quand les cellules de la paroi externe du tégument, le testa, se vident de leur contenu cytoplasmique. La paroi externe est souvent effondrée et plus ou moins appliquée contre la paroi basale (Aber et Sallé, 1983). L'observation des ornements des téguments des graines d'orobanche peut ainsi servir de clé de détermination taxonomique (Plaza *et al.*, 2004) (Figure 12 page 36). Les réserves de la graine d'orobanche sont de nature lipidique et amylicée (Bar-nun *et al.*, 2002). L'organisation embryonnaire de l'orobanche n'est en rien commune à celle des plantes autotrophes. En effet, ni cotylédons, ni gemmule et radicule ne peuvent être observés (Joel *et al.*, 2011b) (Figure 13 page 38).

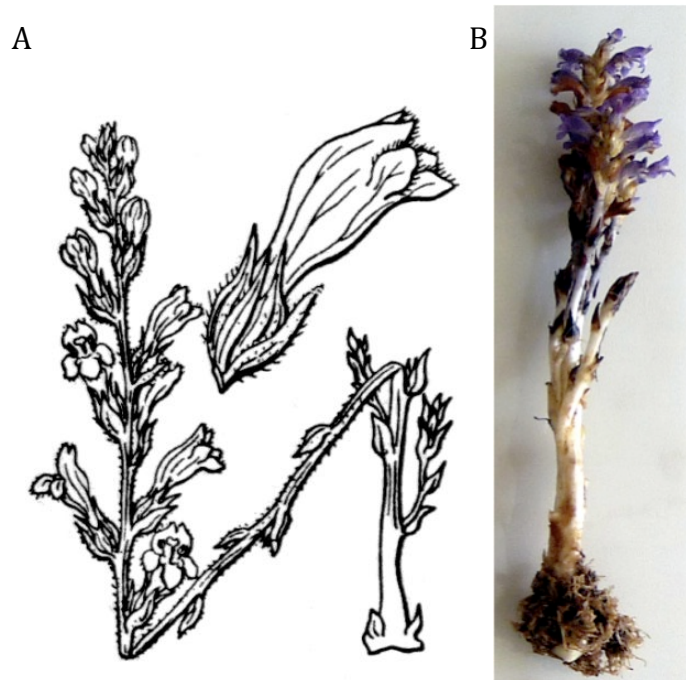


Figure 11 : (A) Dessin de *Phelipanche ramosa* (d'après Coste 1901-1906) ; (B) Photographie de *Phelipanche ramosa* sur colza (LBPV, Z. Gaudin)

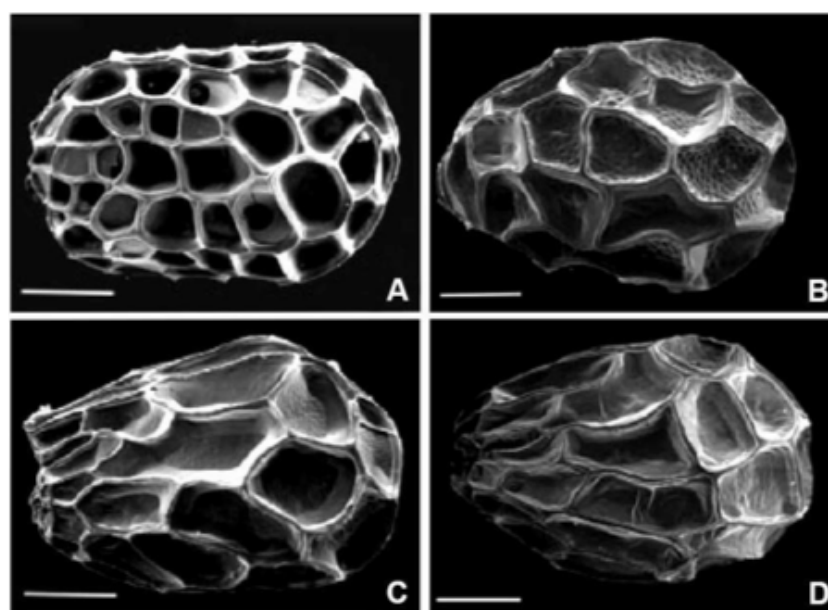


Figure 12 : Morphologie externe des graines (ornementation tégumentaire) de différentes espèces d'orobanche observées en microscopie électronique à balayage (d'après Plaza *et al.*, 2004). (A) *O. rapum genistea*. (B) *O. laserpitii-sileris*. (C) *O. alba*. (D) *O. densiflora*.

1.2.3.3. Le conditionnement

Les graines d'orobanche, pour germer, doivent subir une étape de conditionnement d'environ 7 jours à des températures comprises entre 18 °C et 23 °C et une humidité relative de 90 % (Gibot-Leclerc *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). La graine d'orobanche, une fois conditionnée, ne peut alors germer qu'après perception d'un stimulus externe. La germination est en effet déclenchée par un stimulus contenu dans les exsudats racinaires de la plante hôte à proximité de la graine d'orobanche (pas plus d'1/2 cm). Dans le cas où la graine d'orobanche ne perçoit pas de stimulus de germination, elle peut alors entrer de nouveau en phase de dormance secondaire (Kebreab et Murdoch, 1999). Suivant une phase de déshydratation prolongée, elle peut néanmoins retrouver toute sa capacité germinative après une nouvelle phase de conditionnement (Fer et Thalouarn, 1997).

1.2.3.4. La germination

La perception du signal d'induction de la germination déclenche le début de l'interaction entre la plante hôte et l'orobanche. Le premier inducteur de la germination a été mis en évidence originalement chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum*, plante non hôte), il s'agit du strigol qui a la capacité d'induire la germination des graines de *Striga lutea* Lour. (Cook, *et al.*, 1966). Les principaux composés qui induisent cette germination sont les strigolactones qui appartiennent à la famille des sesquiterpènes lactones (orobanchol, strigol, sorgolactone). Depuis, de nombreuses molécules ont été découvertes telles que le déhydrocostus lactone (Joel *et al.*, 2011a) et les isothiocyanates (2-phenylethyl isothiocyanate [2-PEITC]) (Auger *et al.* 2012), ou bien synthétisées comme le Nijmegen1 et le GR24, des analogues structuraux des strigolactones (Wigchert *et al.*, 1999) (Figure 14). Le GR24 sert de molécule de référence pour l'induction de la germination dans de nombreux travaux de recherche. En 2006, Virtue *et al.* suggéraient que les ITC pouvaient provoquer la germination

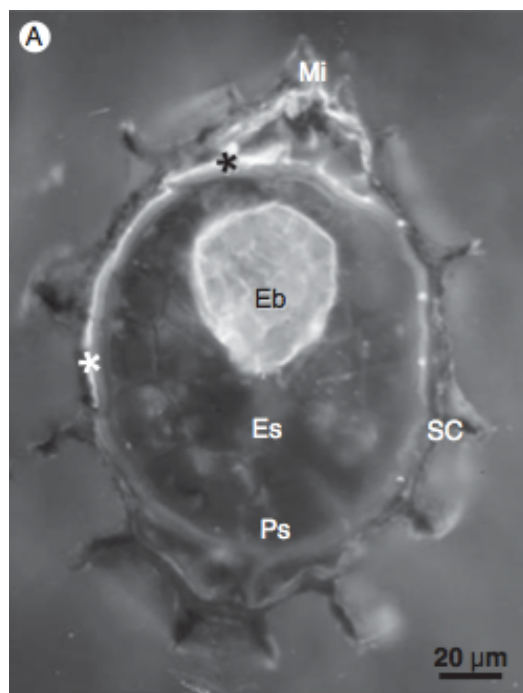


Figure 13 : Coupe longitudinale d'une graine sèche de *Phelipanche aegyptiaca* après immersion dans une solution de calcofluore. La fluorescence est révélée sous UV. **Mi** : micropyle ; **Eb** : embryon ; **Es** : endosperm ; **Ps** : perisperm ; **Sc** : seed coat. (Joel *et al.*, 2011b).

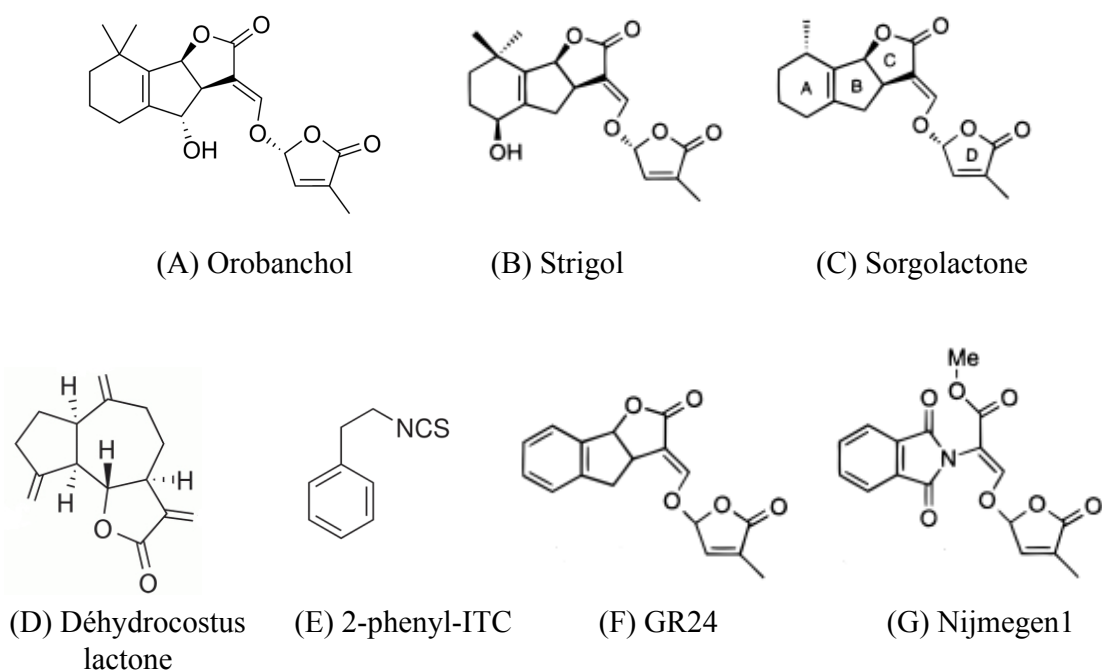


Figure 14 : Formule développée des molécules inductrices de la germination des graines d'orobanche. Molécules naturelles (A) Orobanchol, (B) Strigol, (C) Sorgolactone, (D) Déhydrocostus lactone, (E) 2-phenyl-isothiocyanate. Molécules de synthèse (F) GR24, (G) Nijmegen-1

des graines d'orobanches. Ce n'est qu'en 2012 que Auger *et al.* ont clairement démontré que les ITC étaient les composés majoritaires induisant la germination des orobanches chez le colza. Ceux-ci seraient les produits de la dégradation enzymatique des glucosinolates (GLC) produits par le colza par des myrosinases sécrétées par les microorganismes.

Le cycle de développement de l'orobanche se calque sur les étapes de croissance de sa plante hôte (Figure 15 page 40). Une fois que la graine a perçu le signal de germination celle-ci émet un organe appelé radicule ou encore procaulôme qui se dirige par chimiotropisme positif vers la racine de la plante hôte. Ce procaulôme ne ressemble en rien à une tige ou à une racine ; il est composé essentiellement de cellules parenchymateuses avec en son extrémité un ensemble de cellules méristématiques, mais ne possède pas de coiffe comme une racine caractéristique des plantes autotrophes. De plus, celui-ci ne contient aucun élément conducteur. Il a pour rôle de venir se fixer à la surface de la racine de la plante hôte (Aber et Sallé, 1983).

1.2.3.5. Contact et fixation sur la racine de l'hôte

L'apex du procaulôme au contact de la racine de la plante hôte s'étale et les cellules à son extrémité se différencient en sortes de papilles. La surface papillaire forme des protubérances qui sécrètent une substance glucidique mucilagineuse adhésive permettant de lier le parasite à son hôte (Joel et Losner-Goshen, 1994). C'est alors que la phase parasitaire s'initie. L'extrémité du procaulôme se différencie en une structure ressemblant à un appressorium qui par action mécanique et dégradation enzymatique va permettre l'intrusion des cellules du parasite dans l'hôte. L'intrusion se fait grâce des Pectine-Methyl-Esterase (PME) lors d'une réaction de dé-estérification des pectines des parois des cellules de l'hôte à laquelle s'ajoute l'activité de polygalacturonases provoquant la dégradation complète des

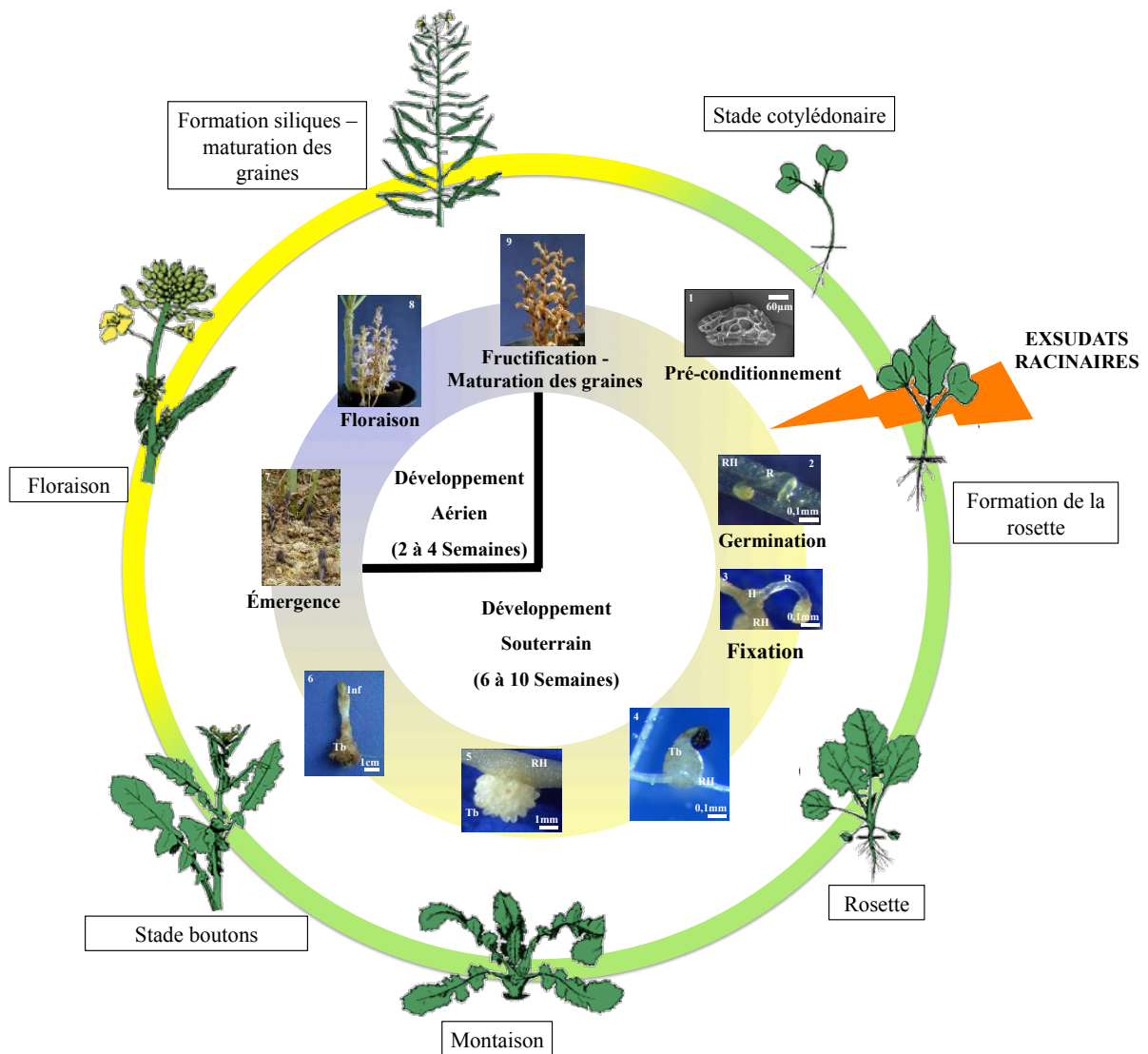


Figure 15 : Cycle de développement de *Phelipanche ramosa* calqué sur le cycle de développement de son hôte le colza. **RH** : racine de la plante hôte ; **T** : tégument ; **R** : radicule ou procaulôme ; **Tb** : tubercule ; **inf** : inflorescence.

pectines permettant ainsi l'intrusion des cellules du parasite dans l'hôte (Losner-Goshen *et al.*, 1998 ; Véronesi *et al.*, 2005 ; Véronesi *et al.*, 2007).

1.2.3.6. Connexion du parasite aux tissus vasculaires de l'hôte

Une fois, la pénétration dans l'hôte effectuée, des connexions vasculaires vont s'établir dans le but d'instaurer une relation trophique de l'hôte vers le parasite. Le parasite va alors différencier ses cellules en un haustorium. La partie de l'haustorium intimement connectée au tissu vasculaire de l'hôte est appelé endophyte et est communément comparée à un « suçoir ». L'orobanche est considérée comme une plante parasite de type « phloem feeder » essentiellement ; c'est à dire qu'à partir de la connexion du parasite sur son hôte, il s'établit un continuum entre les phloèmes des deux partenaires (Dörr et Kollmann, 1995). L'orobanche étant hétérotrophe, elle va puiser dans le phloème les photoassimilats fabriqués par photosynthèse chez l'hôte. Tous les éléments nutritifs de l'hôte sont véhiculés via les tubes criblés du phloème, des organes sources (les feuilles) jusqu'aux organes puits tels que les graines, les jeunes feuilles, les racines, ainsi que l'orobanche considérée alors comme un nouvel organe puits (Draie *et al.*, 2011). Certaines plantes parasites sont connectées également via le xylème à leur hôte. C'est le cas des strigas qui étant hémiparasites sont capables de réaliser la photosynthèse. Les cellules du parasite se différencient en éléments de vaisseaux de type xylémien afin de prélever par l'intermédiaire de l'hôte l'eau et les sels minéraux.

L'examen de coupes d'haustoria montre une interaction intimement liée entre l'hôte et le parasite qui permet l'échange des substances nutritives. La zone de jonction entre les deux partenaires consiste en un arrangement de différents tissus, composés de cellules de tailles et de formes variées rendant la distinction difficile entre les deux partenaires. L'arrangement des tissus n'est pas seulement le résultat de l'invasion des tissus de l'hôte par l'haustorium, mais

aussi par la prolifération des cellules de l'hôte qui forment un complexe cellulaire ressemblant à un cal entourant les tissus du parasite (Dörr et Kollmann, 1995).

1.2.3.7. Développement souterrain et émergence du parasite

Lorsque l'interaction entre l'hôte et le parasite est bien établie, l'orobanche commence alors à puiser dans les ressources de la plante hôte. Rapidement, l'orobanche forme un tubercule qui peut mesurer jusqu'à 5 cm de diamètre. Ce tubercule est l'organe de réserve de l'orobanche et accumule essentiellement des hexoses, du mannitol, des acides aminés et de l'amidon localisé au niveau du parenchyme cortical du tubercule (Singh *et al.*, 1968 ; Aber et Sallé, 1983 ; Abbes *et al.*, 2009 ; Draie, 2009). Sur ce tubercule se développent alors de nombreuses racines adventives. Celles-ci, possèdent un épiderme, un parenchyme cortical et des vaisseaux conducteurs, mais sont dépourvues de coiffe et d'une zone pilifère ce qui les rends inefficaces dans le prélèvement d'eau et de sels minéraux. Ces racines étant de jeunes organes en croissance participeraient à la force de puits du tubercule de l'orobanche (Péron, 2010). Ces racines adventives peuvent aussi développer des haustoria secondaires qui seront capables de se fixer à d'autres racines. Une tige écailleuse achlorophyllienne va alors se former à partir d'un bourgeon caulinaire du tubercule et va rapidement émerger du sol grâce aux réserves accumulées. Cette tige portera l'inflorescence comportant plusieurs dizaines de fleurs. Chaque capsule peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de graines. Une fois ces graines disséminées dans l'environnement elles vont entrer en dormance en attente des conditions optimales de levée de dormance (phase de conditionnement) pour pouvoir acquérir leur aptitude à germer en présence d'un hôte compatible.

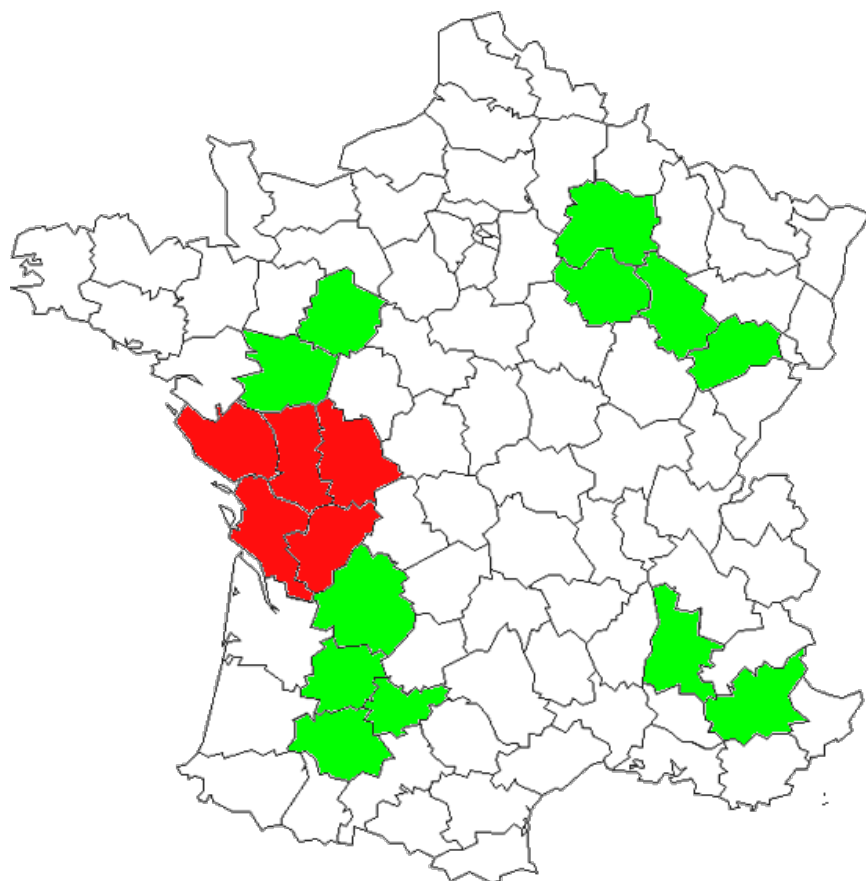
1.2.3.8. Impact sur la culture

La période la plus dommageable pour la culture d'intérêt se situe pendant la phase de développement souterrain de l'orobanche. En effet pendant cette phase, l'orobanche prélève une partie des photoassimilats de la plante hôte. En cas de fortes infestations de la plante, jusqu'à une centaine de tubercules d'orobanche rameuse a pu être dénombré sur l'appareil racinaire de colza, le prélèvement drastique des photoassimilats pouvant alors conduire à la mort de la plante. Il est noté que *Orobanche cernua* prélève 73 % du carbone transitant vers la racine chez le tabac (99 % de ce carbone provient du phloème de l'hôte), et des sels minéraux dans le xylème de l'hôte (Hibberd *et al.*, 1999). Certaines substances prélevées telles que le saccharose et le potassium provoqueraient l'abaissement du potentiel osmotique du parasite induisant la mise en place d'un gradient osmotique dommageable à l'hôte puisque celui-ci entraînerait un stress hydrique chez l'hôte. Enfin, comme l'orobanche est la plus dommageable à la culture lors de sa phase de développement souterrain, il est souvent trop tard pour pouvoir intervenir sur la culture. Il n'existe pas de chiffres précis sur les pertes de rendement occasionnées mais l'on sait qu'en cas de fortes infestations toute la culture peut être perdue. Pour exemple, en Espagne la culture de colza a été partiellement abandonnée dans les années 90' à cause de taux d'infestation importants de *P. ramosa* (Sobrino Vesperinas, 1982). En 1985, Sobrino-Vesperinas a recherché des sources de résistance dans 33 génotypes de colza, mais n'a au final pas mis en évidence de résistance totale. Les quelques études suivantes disponibles sur l'interaction colza-orobanche rameuse montrent en effet l'absence de résistance du colza vis-à-vis de l'orobanche rameuse. Ainsi, le comportement de 15 génotypes de colza vis-à-vis de *P. ramosa* a été étudié en serre (Zehhar *et al.*, 2003). Tous les génotypes testés ont montré une sensibilité à l'orobanche avec une variabilité importante entre les génotypes allant de deux fixations pour les moins sensibles à plus de 10 fixations par plante pour les plus sensibles. Enfin, Buschmann *et al.*, (2005) ont

testé la sensibilité de deux génotypes de colzas (colza d'hiver et colza de printemps) qui se sont montrés très sensibles puisque les taux d'infestations atteignent jusqu'à plus de 500 fixations pour deux plants de colza par pot.

1.2.3.9. Diversité génétique de l'orobanche rameuse

L'étude de la diversité génétique des graines d'orobanche sur le territoire français a révélé l'existence de trois types génétiques distincts (Voisin *et al.*, 2011). Ces trois types ont été déterminés par l'étude de la virulence des graines d'orobanche lors de la réalisation d'infestations croisées sur quatre espèces cultivées (colza, chanvre, tournesol et tabac). Les résultats ont montré une spécificité d'hôte qui suggère l'existence de plusieurs pathovars chez *P. ramosa*. La diversité et la structure génétique de *P. ramosa* ont également été analysées en se basant sur deux marqueurs intergéniques d'organites cellulaires (un marqueur mitochondrial et un chloroplastique) et sur cinq loci nucléaires microsatellites. Ces caractérisations ont été réalisées sur des populations de *P. ramosa* localisées dans plusieurs régions françaises récoltées sur différents hôtes incluant cinq espèces cultivées (colza, chanvre, melon, tournesol et tabac) et une espèce adventice (*Geranium dissectum*) couvrant ainsi 650 individus. Les analyses confirment qu'il existe deux types génétiques distincts (type 1 et type 2) et un type « hybride » des types 1 et 2. Le type 1 est très polyphage ; sa gamme d'hôte est large (colza, tournesol, melon, tabac, chou et adventices) mais est préférentiel du colza. Le type 2 est plus spécifique, et présent surtout dans l'Ouest et l'Est de la France notamment sur les parcelles de Chanvre. Enfin le type 3 hybride est essentiellement dans le Sud et l'Est de la France avec une affinité au tabac. Dans l'ouest de la France, en Poitou-Charentes, les espèces hôtes sont exclusivement infestées par le type 1.



 Secteurs fortement infestés  Secteurs avec infestations recensées

Figure 16 : Carte de répartition des secteurs recensés par le CETIOM infestés par *Phelipanche ramosa* sur colza en France en 2011.

1.3. Enjeu économique

Les particularités biologiques des orobanches font d'elles de redoutables agents pathogènes pour les cultures. En effet, la longévité des graines dans le sol, le détournement des substances nutritives de l'hôte pendant la phase de développement souterrain, et la capacité à être largement disséminées dans l'environnement font des orobanches un problème agronomique majeur et constitue donc un enjeu prioritaire dans le développement de méthodes de lutte.

Il est désormais admis que le problème orobanche en France est préoccupant depuis les années 1990 pour la culture du colza. Elle est présente dans de nombreux départements Français et le risque lié à son extension est réel. En effet le stock grainier de l'orobanche en l'absence de son hôte « cultivé » peut être entretenu par des plantes adventices qui peuvent être également hôtes de l'orobanche (Gibot-Leclerc *et al.*, 2003). Dans ce cas, des rotations de cultures longues ou des mises en jachère de parcelles pourraient ne pas s'avérer efficaces pour enrayer ce problème.

La gestion des orobanches sur colza est rendue extrêmement difficile par l'absence de cultures tolérantes aux herbicides à large spectre en Europe et par la réduction de la disponibilité des matières actives depuis les différents « Grenelle de l'environnement ». En France, la surface touchée par l'orobanche est estimée à 50 000 ha localisés essentiellement dans la région Poitou-Charentes ainsi que quelques foyers répartis dans le Sud et l'Est de la France (Figure 16).

2. Etude de l'interaction *P. ramosa* / *B. napus* et développement de méthodes de lutte contre l'orobanche

2.1. Quelques définitions et concepts

Les végétaux, en raison de leur mode de vie fixé au sol, subissent de nombreuses agressions biotiques ou abiotiques. Ils sont la cible de nombreux agents pathogènes tels que les bactéries, les virus, les champignons, les nématodes ainsi que les plantes parasites. Ne pouvant se soustraire à leur environnement, les végétaux ont développé de nombreux modes de défense qui peuvent être constitutifs (génétiques, physiques...) ou induits (LAR : Localized Acquired Resistance, SAR : Systemic Acquired Resistance). De façon générale, les végétaux sont résistants à la grande majorité des agents pathogènes ; l'interaction est alors qualifiée de « non-hôte », c'est à dire qu'une espèce végétale est totalement résistante à toutes les espèces/races d'un agent pathogène donné. Dans certains cas, une relation hôte-pathogène peut cependant s'établir. Il s'agit d'une relation « hôte » qui est compatible quand le pathogène est invasif, la plante est alors sensible et l'interaction peut conduire à la mort de l'hôte. A l'inverse, une relation « hôte incompatible » se met en place quand la plante développe des mécanismes de résistance efficaces contre le pathogène, la plante est alors résistante. Enfin, lors d'une interaction compatible, les plantes d'une même espèce peuvent présenter des niveaux intermédiaires de sensibilité entre la sensibilité et la résistance totale : on considère alors qu'il existe une résistance partielle de l'hôte envers l'agent pathogène. Au niveau agronomique la résistance partielle est souvent confondue avec la notion de tolérance. La tolérance vis-à-vis d'un agent pathogène se quantifie sur le plan des symptômes ou des dégâts subis par les cultures. La tolérance caractérise les plantes capables d'être colonisées par un agent pathogène, de supporter sa multiplication, sans présenter de symptômes importants et d'assurer une production satisfaisante malgré leur infection par un pathogène (Lepoivre, 2003).

2.2. Gestion des plantes parasites

La nature complexe de l'orobanche en fait un agent pathogène difficile à éradiquer. En effet, son cycle de développement étant intimement lié à son hôte, l'utilisation d'herbicides non spécifiques est alors rendue délicate. . Cependant quelques méthodes de lutte sont appliquées à l'heure actuelle dans le but de freiner au maximum la dissémination du parasite et de diminuer l'impact néfaste sur les cultures d'intérêt agronomique.

2.2.1. Les techniques culturales

L'ensemble des techniques culturales utilisé afin de maîtriser le développement de l'orobanche (et des plantes parasites en général) a révélé sa limite d'efficacité et de mise en œuvre. La seule méthode réellement efficace est l'arrachage manuel du parasite. Celui-ci est réalisé lorsque le parasite a émergé du sol mais pas n'est pas encore arrivé au stade reproductif afin d'empêcher la dissémination des graines dans l'environnement. Cette méthode atteint vite ses limites puisqu'elle est extrêmement onéreuse en main d'œuvre et impossible à mettre en place sur des grandes superficies. De plus la culture est déjà fortement impactée puisque lors de la phase souterraine de développement du parasite celui-ci a déjà fortement affaibli la plante hôte. Cette méthode n'est donc recommandée qu'en cas de faible infestation (Rubiales *et al.*, 2011).

De nombreuses techniques culturales ont été employées afin de limiter la prolifération du parasite mais celles-ci se sont révélées peu fiables. Le labour profond est préconisé afin d'enfouir les graines d'orobanche dans le sol au-delà de la zone de fixation sur les racines (Knot *et al.*, 1987). De même un faible semis a montré la réduction de l'incorporation de semences d'orobanche viables dans le sol (Ghersa et Martínez-Ghersa 2000). Un apport d'engrais azotés, peut également être employé, puisqu'il a été montré que dans des proportions assez limitées, il contribuerait par la modification du pH du sol à diminuer le taux

d'infestation de la culture ou à limiter la production de molécules présentes dans les exsudats racinaires nécessaire à l'induction de la germination des graines d'orobanche (Haidar *et al.*, 2003). Yoneyama *et al.* (2001) ont montré que la production de stimulants de la germination d'*Orobanche minor* par le trèfle rouge pouvait être modifiée. L'azote, à des concentrations de 2 à 50 mg.l⁻¹ induit la synthèse de stimulants de germination et l'inhibe dans des concentrations supérieures. Enfin, Des apports de composés ammoniacaux ou phosphatés, tendent quant à eux à inhiber la synthèse de ces stimulants de la germination.

La solarisation est une technique consistant à couvrir durant 4 à 8 semaines le sol d'une bâche de polyéthylène et qui utilise les rayons du soleil l'été pour augmenter la température pour provoquer la mort des graines d'orobanche. Cette technique a été éprouvée pour de nombreuses cultures légumières comme la fève et la lentille contre *P. aegyptiaca* et *O. crenata* (Sauerborn *et al.*, 1989a ; Mauromicale *et al.*, 2001). Enfin l'inondation de la parcelle ou le brulis sont d'autres méthodes physiques employées montrant une efficacité certaine mais qui sont utilisées très localement.

2.2.2. Maitrise des adventices, de la quantité de semences dans le sol et diagnostic du taux d'infestation des lots de semences

La lutte contre l'orobanche et la lutte contre la dissémination des graines dans l'environnement passent non seulement par une bonne connaissance de la culture et une bonne technicité agricole mais aussi par une gestion efficace de l'environnement de la culture d'intérêt notamment par la limitation de la prolifération d'adventices « hôtes » et/ou plantes « faux-hôtes ». Au sein même des parcelles, ainsi qu'en bordure de celles-ci, se développent des plantes adventices qui peuvent être des hôtes potentiels des plantes parasites. D'après Gibot-Leclerc *et al.* (2003), sur 82 adventices recensées et affines au colza dans la région Poitou-Charentes, 50 % d'entre elles sont parasitées par *P. ramosa* et sont donc considérées

comme des plantes qui entretiennent l'inoculum de graines d'orobanche dans le sol tout au long de l'année. Des expérimentations *in vitro* montrent que les exsudats racinaires de certaines adventices non parasitées au champ induisent la germination suicide des graines de *P. ramosa* ce qui en font des adventices faux-hôtes. La maîtrise des adventices de la culture d'intérêt est un point non négligeable à prendre en compte dans le but de limiter au maximum l'entretien et la dissémination des graines du parasite. L'étude de la flore adventice a permis de mettre en place des stratégies de limitation voir de diminution du stock grainier dans le sol. Ces techniques sont employées pendant une jachère et visent à implanter un couvert végétal constitué de plantes faux-hôtes qui induiront la germination suicide des graines d'orobanche ; ou à implanter des plantes hôtes sans intérêt économique (culture piège) qui seront fauchées/récoltées avant que l'orobanche n'ait fini son cycle de développement. Une autre méthode consiste en un traitement de fond du sol par fumigation de composés actifs sous leur forme gazeuse avec une efficacité nématicide, fongicide, herbicide et insecticide et la capacité de tuer les graines d'orobanche. Ces composés tels que le bromure de méthyle sont désormais proscrits d'utilisation en raison de leurs conséquences néfastes sur l'environnement (Warren *et al.*, 2005). La situation dans l'ouest de la France est aujourd'hui préoccupante, à tel point qu'un outil de diagnostic a été développé à la demande de l'interprofession dans le but de contrôler l'état sanitaire des lots de semences de colza en vue de la commercialisation. Cette méthode est basée sur l'isolation de l'ADN de la graine de la plante parasite dans un échantillon de semences commerciales suivie d'une quantification des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) ribosomiques par PCR quantitative (Dongo *et al.*, 2011). La variabilité génétique des ITS permet grâce à cette technique de déterminer la présence de nombreuses orobanches telles que *O. mutelii*, *O. nana*, *O. oxyloba* ou *O. cernua* en plus des deux orobanches les plus alarmantes en France, *P. ramosa* et *O. cumana*. Cet outil s'avère très efficace et permet un gain de temps par rapport à la technique classique d'identification basée

sur l'isolement des graines du parasite et leur identification sous une loupe binoculaire (Kroschel, 2001). La transférabilité de cette technique sur des sols contaminés est en cours d'évaluation (CETIOM, communication personnelle).

2.2.3. Lutte chimique

A l'instar des pathologies communes sévissant sur les cultures d'intérêt économique, la lutte chimique contre les plantes parasites est compliquée dû à la relation intime qu'a développé le pathogène avec l'hôte (connexions vasculaires), et à la faculté germinative des graines d'orobanche dans le sol tout au long de la saison qui implique une pression parasitaire continue. Les herbicides utilisés et efficaces contre l'orobanche sont le glyphosate, les imidazolinones et les sulfonyles. Pour être efficace l'application de ces herbicides doit être répétée et réalisée durant les phases de développement précoce du parasite. Les répétitions du traitement sont très importantes puisque les graines d'orobanche ne cessent de germer durant la saison. Il est donc indispensable de bien comprendre la phénologie et le développement du parasite pour pouvoir appliquer les traitements et obtenir une efficacité importante. Récemment, Eizenberg *et al.* (2004 et 2005) ainsi que Cochavi *et al.* (2011) ont développé un outil prédictif du développement d'*Orobanche minor* sur trèfle et de *Phelipanche aegyptiaca* sur carotte basé sur la somme des températures journalières. Cet outil permettrait de déterminer les périodes propices à l'application d'un traitement phytosanitaire.

Il existe trois stratégies d'application des traitements chimiques. La principale est l'application foliaire sur la plante hôte. L'herbicide étant systémique, est transféré via le phloème de la plante hôte vers le parasite ; celui-ci étant un « puits », il va accumuler l'herbicide. L'herbicide est efficace sur les jeunes plantes parasites déjà fixées sur les racines de l'hôte. Ce type de stratégie est efficace à de faibles doses qui seront répétées (Joël *et al.*, 2007). La seconde stratégie consiste en un traitement de fond du sol où l'herbicide aura un

effet toxique direct sur les graines du parasite, les graines germées, et les jeunes fixations. Enfin la troisième application est basée sur l'utilisation conjointe d'un herbicide et d'une plante hôte résistante à cet herbicide. C'est par exemple, l'utilisation de tabacs résistants au glyphosate conjuguée à l'application du glyphosate (Joel *et al.*, 2005). Cette dernière méthode est certes aujourd'hui la plus efficace et la plus prometteuse pour la maîtrise des plantes parasites mais commence à poser certains problèmes d'ordre environnemental et éthique (organismes génétiquement modifiés, flux de gènes vers d'autres espèces cultivées ou adventices...). D'autres approches ont été développées comme la technologie Clearfield® combinant l'utilisation d'un herbicide (Pulsar40®) avec des cultivars de tournesol hybrides naturellement résistants aux imidazolinones (Tan *et al.*, 2005). En France, le CETIOM a déjà commencé à tester des variétés de tournesols Clearfield® en 2009. Cette technologie a aussi été développée sur colza (Weston *et al.*, 2011) et devrait être aussi testée dans le cadre de la lutte contre *P. ramosa*.

2.2.4. Lutte biologique

La lutte biologique est une méthode qui consiste à lutter de manière naturelle contre un agent pathogène soit par l'utilisation de composés naturels stimulateurs des défenses des plantes (SDN) soit par des organismes vivants antagonistes de l'agent pathogène présent. Récemment, il a été montré que la SAR de la plante hôte pouvait être utilisée pour lutter contre l'orobanche (Sauerborn *et al.*, 2002 ; Gonsior *et al.*, 2004 ; Pérez-de-luque *et al.*, 2004 ; Veronesi *et al.*, 2009). Après l'application de l'inducteur de défense Bion® (BTH : benzothiadiazole, benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid (S) methylester, Syngenta), la mise en place de mécanismes de défense est stimulée dans les racines hôtes lui permettant de se défendre plus efficacement contre le parasite.

Une approche plus écologique consiste à utiliser des agents pathogènes spécifiques de l'orobanche comme certains insectes et champignons. Ainsi, la mouche *Phytomyza orobanchia* Kalt est rapportée comme étant très spécifique de l'orobanche. La répartition géographique de cette mouche est calquée sur la répartition des orobanches. La mouche pond dans les capsules des fleurs d'orobanche et la larve perturbe alors le développement des graines. La grande capacité de production en graines de l'orobanche ne permet cependant pas un contrôle total mais aide à réduire l'inoculum du sol (Klein *et al.*, 1999). D'autre part, il a été dénombré qu'une trentaine de genres de champignons se développent sur *Orobanche* spp. Ceux-ci sont caractérisés par une très grande spécificité vis-à-vis de leur hôte. Il ressort que le genre *Fusarium*, notamment *Fusarium oxysporum*, agit essentiellement pendant la phase de développement souterrain de l'orobanche. Il a été montré qu'après l'application d'une suspension de conidies de *F. oxysporum* sur *O. cumana*, le champignon réussit à pénétrer le testa de la graine. La paroi de l'endosperme est dissoute, le cytoplasme est dégradé et les membranes lipidiques sont abîmées dans les graines infestées. L'endosperme riche en composés lipidiques et protéiques serait utilisé par le champignon comme source nutritive (Thomas *et al.*, 1999). Son emploi peut aider à améliorer le rendement grainier de la plante d'intérêt attaquée et à diminuer l'impact de l'orobanche en détruisant les jeunes stades d'orobanche fixés. En expérimentations *in vitro*, tous les stades d'orobanche peuvent être attaqués, de la graine non-germée jusqu'au stade de hampe florale développée. L'application de suspensions de spores de ces champignons peut devenir un moyen relativement efficace afin de maîtriser l'expansion de l'orobanche mais les études en plein champ demeurent rares à ce jour.

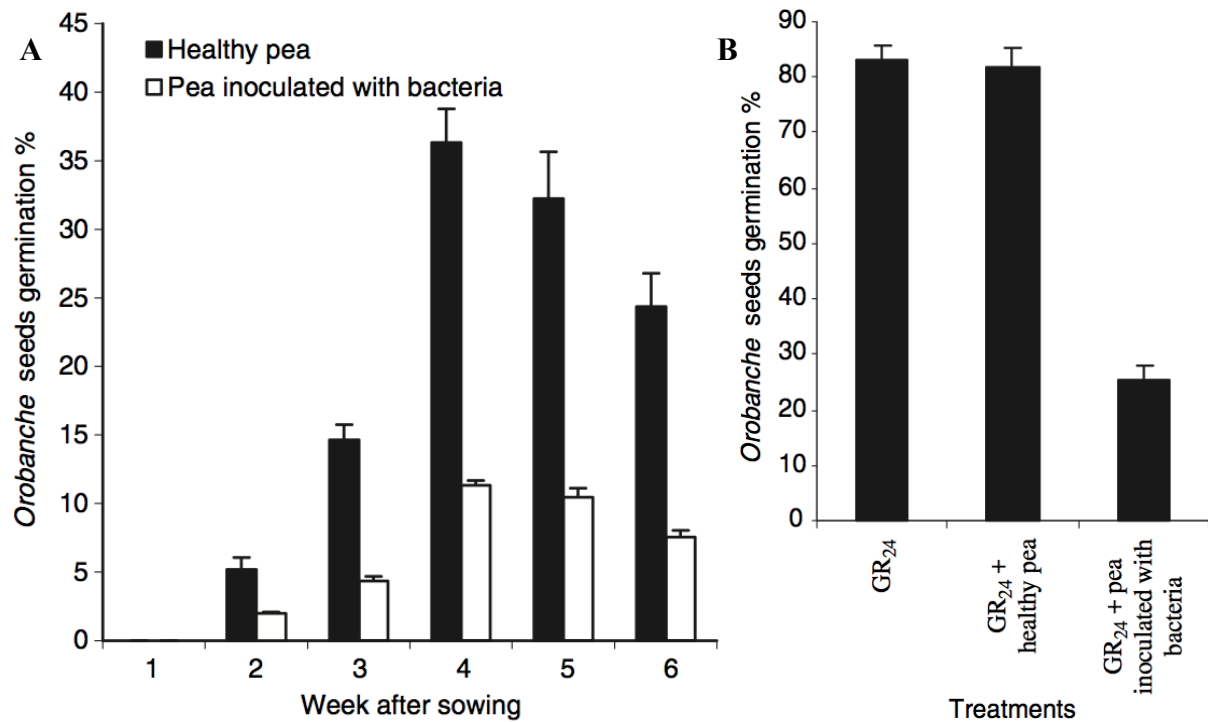


Figure 17 : Effet des exsudats racinaires de pois sur la germination *in vitro* de graines d'*Orobancha crenata*. Les pois en association avec la bactérie sont moins sensibles à l'orobanche. **(A)** : Les exsudats sont récoltés sur des plantules âgées de 1 à 6 semaines. La germination est exprimée en % de graines viables stimulées par les exsudats racinaires. **(B)** : Exsudats extraits de plantules âgées de 4 semaines. La germination est exprimée en % de graines viables stimulées par du GR24 (Mabrouk *et al.*, 2007b).

Enfin, chez le pois cultivé en symbiose avec la bactérie *Rhizobium leguminosarum*, il a été démontré une diminution du taux d'infestation d'*O. crenata* résultant d'une part d'une diminution du taux de germination au contact des racines et d'autre part de l'apparition de nécroses avant et après la fixation des orobanches (Mabrouk *et al.*, 2007a). Ces observations s'accompagnent également d'une activité accrue des peroxydases, de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (Mabrouk *et al.*, 2007a) et des polyphénols oxydases (PPO) (Mabrouk *et al.*, 2010) dans les racines, qui sont impliquées dans les mécanismes de défense des plantes. Le taux de germination des graines d'*Orobanche crenata* se voit drastiquement diminué quand elles sont induites par du GR24 et des exsudats racinaires, en comparaison avec des plantes inoculées par des bactéries ou non (Mabrouk *et al.*, 2007b) (Figure 17). Ce phénomène serait dû à l'accumulation de composés toxiques appartenant à la classe des composés phénoliques qui augmentent fortement lors de l'interaction, tel que l'acide gallique et la naringénine. L'augmentation de toutes ces activités enzymatiques et de l'augmentation des composés phénoliques totaux s'accompagnent également d'une augmentation du contenu en lignine dans les racines inoculées par la bactérie (Nicholson *et* Hammerschmidt, 1992 ; Mabrouk *et al.*, 2010) (Figure 18 page 66).

Si l'utilisation d'auxiliaires de cultures dans la lutte contre l'orobanche est efficace au laboratoire, le bilan en plein champ est quant à lui mitigé ; l'utilisation exclusive des auxiliaires de cultures ne répond pas aux exigences des agriculteurs. L'approche de lutte biologique ne peut venir qu'en soutien des méthodes de lutte plus classiques.

2.2.5. Les sources de résistance

Les études réalisées sur la recherche de ressources résistantes aux plantes parasites montrent les difficultés face auxquelles l'ensemble de la communauté scientifique se heurte. En effet, les modèles de plantes parasites étudiés sont très variés (orobanches, strigas,

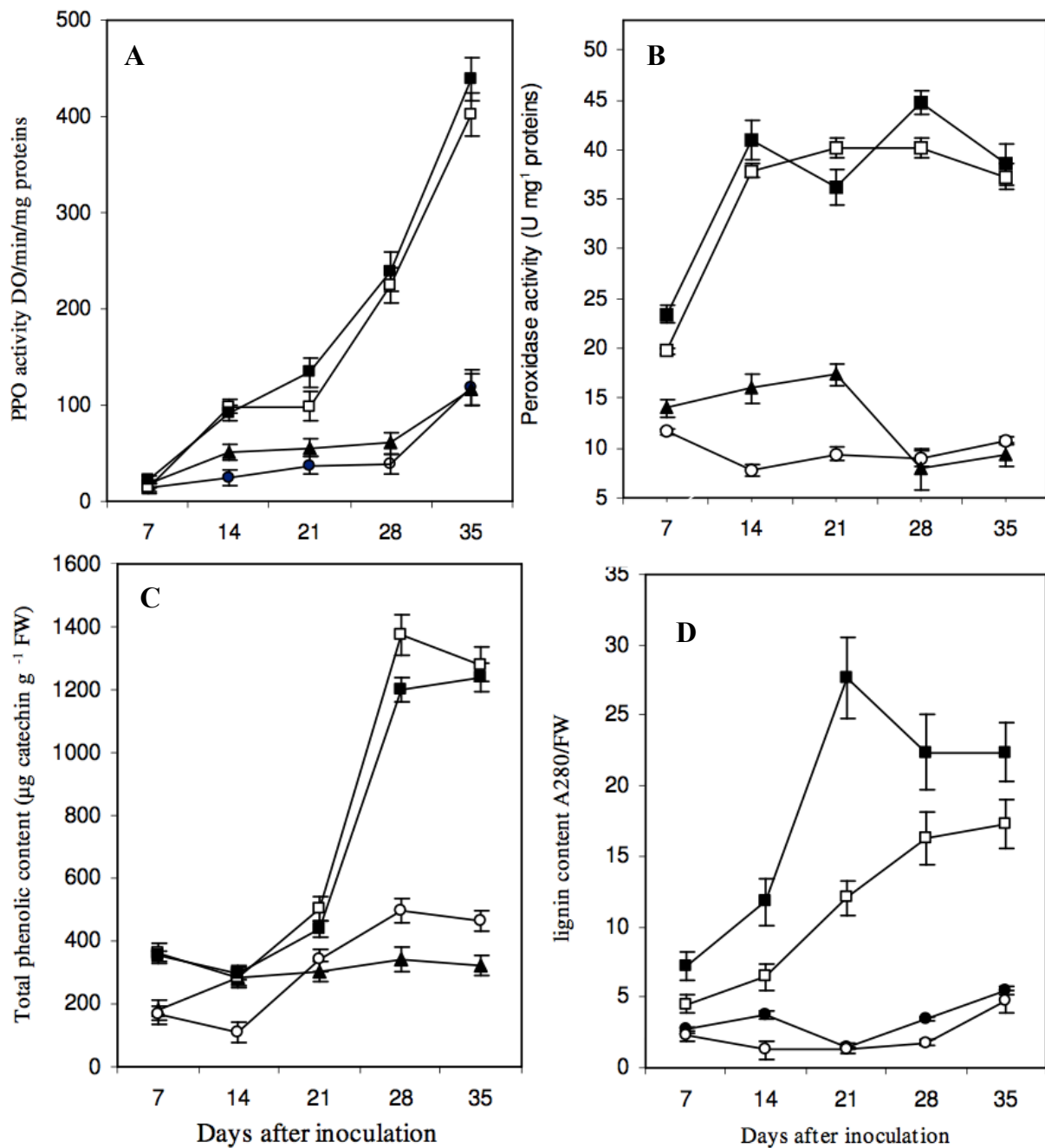


Figure 18 : (A-B) : modification des activités PPO et peroxydase dans les racines de pois inoculées par *Rhizobium leguminosarum* et infestées par *Orobanche crenata*. Les activités sont mesurées à 7, 14, 21, 28 et 35 jours après inoculation et infestation. L'association pois-bactérie provoque une augmentation de la quantité de produits phénoliques dans les racines du pois.

(C-D) : modification de la teneur en composés phénoliques totaux et en lignine des racines de pois inoculées par *Rhizobium leguminosarum* et infestées par *Orobanche crenata*.

Pois contrôles sans *R. leguminosarum* ni *Orobanche crenata* (○); pois inoculés par *R. leguminosarum* et infestés par *O. crenata* (□); pois inoculés seulement par *R. leguminosarum* (■); pois infestés seulement par *O. crenata* (●) (Mabrouk *et al.*, 2010).

cuscutes...) et couvrent de nombreuses interactions réparties tout autour du globe. Les méthodes classiques de contrôle des plantes parasites ont montré leur limite. La résistance par une approche génétique semble plus adaptée à inclure dans une approche de lutte intégrée et a été largement développée dans les interactions *Orobanche* sp. - tournesol ou légumineuses. Il ressort que ces plantes parasites ont des comportements très variables vis-à-vis de leurs hôtes et évoluent rapidement contournant les nouvelles résistances créées (Román *et al.*, 2002a). Ce problème pourrait être résolu par le développement de résistances horizontales polygéniques (approche par QTL : Quantitative Trait Loci) en addition des résistances verticales de type monogénique utilisées depuis longtemps par les sélectionneurs, mais facilement contournées (Román *et al.*, 2002b). La stratégie actuelle vise à développer des résistances multiples pyramidales face aux plantes parasites. La difficulté réside aussi dans le fait que les résistances polygéniques ont une faible héritabilité et que les mécanismes de résistance connus sont partiels ce qui oblige à se rapprocher des espèces sauvages lors des programmes de sélection (Rubiales *et al.*, 2003a). Les différents niveaux où il est possible de développer des résistances correspondent à plusieurs étapes du cycle de développement de la plante hôte : l'induction de la germination, l'étape de pré- ou post-fixation et le développement tardif de l'orobanche.

2.2.5.1. Les mécanismes de résistance connus

2.2.5.1.1. La germination

L'induction de la germination des graines par les stimulants produits par l'hôte est une étape clé dans l'établissement de l'interaction. Pour une même espèce d'hôte, il est possible d'identifier toute une gamme de variétés stimulant plus ou moins cette germination. Ainsi des études menées chez des plantes cultivées telles que *Lathyrus* et *Vicia* (Sillero *et al.* 2005 a et b), le pois (Rubiales *et al.*, 2003b ; Pérez-de-Luque *et al.*, 2005a), le pois chiche

(Rubiales *et al.*, 2003c) ou encore le tournesol (Jorrín *et al.*, 1999 ; Labrousse *et al.*, 2001), ont mis en évidence des accessions peu stimulatrices de la germination des orobanches. Dans l'optique de développer une résistance, il paraît donc nécessaire d'une part de poursuivre la recherche de génotypes peu stimulants mais aussi d'élucider les voies de biosynthèse des stimulants de germination. Ainsi, l'une des principale voie de biosynthèse des stimulants de germination mise en évidence est celle des caroténoïdes menant à la synthèse des strigolactones (Matusova *et al.*, 2005). Récemment, deux études ont montré que les strigolactones ne sont pas exclusivement impliquées dans la germination des plantes parasites mais interviennent aussi dans le phénomène d'inhibition de l'architecture des plantes (Gomez-Roldan *et al.*, 2008) et le développement des symbioses mycorhiziennes (Umehara *et al.*, 2008). Ces deux études mettent en évidence que la voie de biosynthèse des strigolactones fait intervenir dans la voie des caroténoïdes deux gènes *ccd7* et *ccd8* (carotenoid cleavage dioxygenase). Ces avancées ouvrent ainsi les portes d'une sélection assistée par marqueurs (MAS) pour la création de cultivars faiblement producteurs de stimulants de la germination des graines des orobanches. Cependant, dans le cas du colza, cette approche risque de s'avérer compromise du fait du rôle majeur des ITC dans le processus de germination de *P. ramosa* (Auger *et al.*, 2012).

Dans le but d'éviter l'induction de la germination des graines, d'autres mécanismes ont été étudiés comme l'exsudation d'inhibiteurs de la germination des plantes parasites. Lors de l'interaction entre *Phelipanche aegyptiaca* – tomate, des essais réalisés avec des exsudats racinaires de tomates cultivée (*Lycopersicon esculentum*) ou sauvage (*Lycopersicon pennelli*) montrent une réduction significative du taux de germination des graines d'orobanche. En effet, les exsudats racinaires de *L. pennelli* n'induisent la germination de l'orobanche que quand les extraits purs sont dilués dans de l'eau. De plus l'ajout d'exsudats racinaires de cette tomate sauvage à une solution de GR24 fait diminuer le taux de germination des orobanches par

rapport au témoin GR24 (El Halmouch *et al.*, 2006). Chez le tournesol, la résistance de certains cultivars se caractérise par l'accumulation dans leurs racines ou dans leurs exsudats racinaires de coumarines inhibant de 50 % la germination des graines d'*O. cernua* (Serghini *et al.*, 2001). De plus, les graines germées au contact des exsudats racinaires des plantes résistantes présentent un brunissement caractéristique d'un effet toxique. Il est suggéré que cette coumarine joue un rôle défensif qui prévient le succès de la germination ainsi que la pénétration et/ou la connexion aux tissus vasculaires de l'hôte.

2.2.5.1.2. Les mécanismes de résistance durant la fixation du parasite

Des résistances précoces peuvent s'exprimer durant la phase de fixation du parasite sur les racines de l'hôte. Ces résistances se caractérisent par un renforcement pariétal des cellules de l'hôte bloquant la fixation et/ou par un empêchement de la connexion du parasite au système vasculaire de la plante hôte (Labrousse *et al.*, 2001; Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006). Dans tous les cas, ces processus structurels et biochimiques de défense conduisent à la nécrose du parasite. Ces mécanismes correspondent à l'activation de la voie de synthèse des phenylpropanoïdes conduisant à la production de composés comme la lignine, la subérine et des flavonoïdes chez le pois (Mabrouk *et al.*, 2007b). Chez le tournesol, dans le cas d'une interaction incompatible, un brunissement caractéristique de nécroses des tissus de l'hôte et/ou du parasite est observé au niveau du point de fixation : 40 % des jeunes fixations puis 60 % des tubercules en développement sont ainsi affectés (Pérez de Luque *et al.*, 2005a). Ce type de résistance est retrouvé dans diverses interactions comme *O. cumana*-tournesol (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006), *O. aegyptiaca*-vesce (Goldwasser *et al.*, 1997) ou *O. crenata*-pois (Pérez-de-Luque *et al.*, 2005a). Une fois la fixation réalisée, l'invasion des cellules du parasite peut être stoppée à trois niveaux différents : (i) le premier barrage se situe au niveau du cortex de la racine avant d'atteindre l'endoderme. Chez le pois, la fève, et le

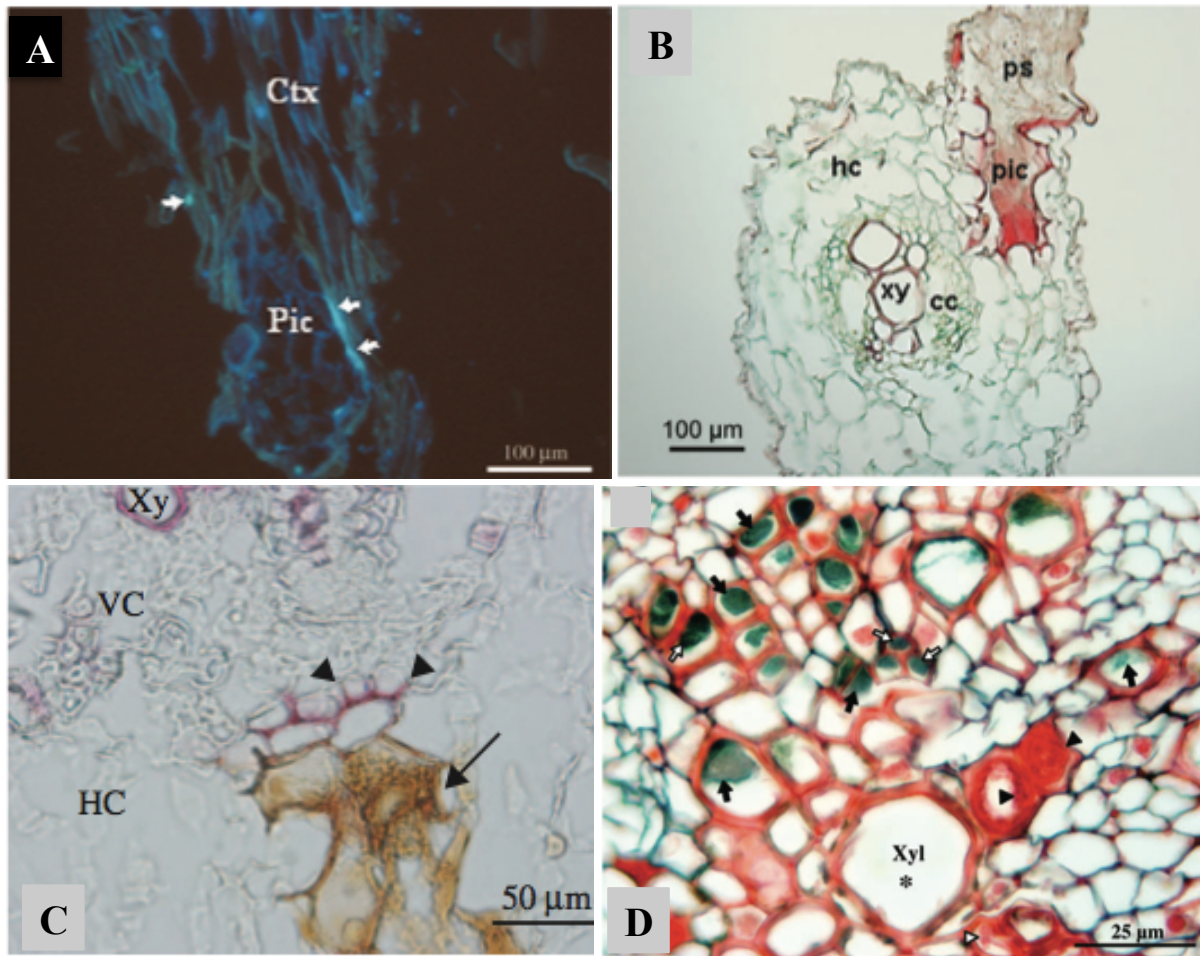


Figure 19 : Mécanismes de résistance durant la fixation du parasite, au niveau du cortex (**A** et **B**), au niveau de l'endoderme (**C**), ou au niveau des vaisseaux conducteurs (dans le cylindre centrale) (**D**).

(**A**) Coupe longitudinale d'une interaction incompatible de *O. crenata* sur un pois résistant marqué au bleu d'aniline pour détecter les calloses (flèches) (fluorescence 340-380 nm) (Pérez-de-Luque *et al.*, 2006). (Ctx) cortex ; (pic) parasite intrusive cells

(**B**) Marquage de la subérine par la coloration avec du safranine-vert d'Alcian (AGS) montrant comment les cellules intrusives de *O. cumana* sur tournesol sont stoppées au niveau du cortex avant d'atteindre l'endoderme (Echevarria-Zomeno *et al.*, 2006). (Hc) host Cortex ; (Xy) xylème vessls; (cc) cylindre central ; (pic) parasite intrusive cells ; (ps) parasite seedling

(**C**) Pénétration des cellules de *O. crenata* sur pois stoppée au niveau du péricycle par lignification des cellules de l'hôte (têtes de flèches). Les flèches montrent en plus l'accumulation d'une substance marron colorée au phloroglucinol acide (Pérez-de-Luque *et al.*, 2005b). (Xy) xylem vessels ; (Vc) Host vascular cylinder ; (Hc) Host cortex.

(**D**) Coupe d'une interaction entre *O. crenata* et *Vicia sativa* résistante. Coloration à l'AGS des lignines et des polyphénols apparaît en rouge. La coloration verte correspond à des sucres : les flèches indiquant la formation de mucilage dans les vaisseaux du xylème et les têtes de flèches indiquent la présence d'autres composés de remplissage (Pérez-de-Luque *et al.*, 2006). (Xyl) xylem vessels.

tournesol, ceci correspond à un renforcement pariétal et des dépôts de callose (Figure 19 A) (polymère de β -1,3-glucane), processus nécessitant l'intervention de protéines « cross-linking » de type hydroxyproline rich glycoprotein (HRPG), Proline-Rich Protein (PRP) ou encore Glycine-Rich Protein (GRP). Ces protéines sont formées lors d'une attaque par un agent pathogène grâce à la dégradation des parois primaires de l'hôte par du H_2O_2 et des peroxydases accumulés par l'hôte lors du déclenchement d'un choc oxydant (Pérez-de-Luque *et al.*, 2008). Ces barrages s'établissent à l'interface entre les deux organismes auxquels peuvent s'ajouter un processus de subérisation des tissus bloquant ainsi le parasite (Figure 19 B) (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006) ; (ii) dans le cas où les cellules intrusives du parasite atteignent l'endoderme, une lignification de la paroi cellulaire interne se met en place au niveau du péricycle de la racine hôte ainsi que de l'endoderme au contact de l'*haustorium* constituant ainsi un second rempart (Figure 19 C) (Pérez-de-Luque *et al.*, 2005b) ; (iii) enfin, quand les cellules du parasite sont stoppées au niveau des vaisseaux conducteurs du xylème dans le cylindre central, il n'y a pas de renforcement pariétal mis en évidence. Cependant, une forte fluorescence est détectée dans les tissus entourant le point de pénétration dans les vaisseaux du xylème et les espaces intercellulaires, due à la présence de composé phénoliques (phytoalexines) toxiques pour le parasite qui sont transloqués dans le système vasculaire de l'hôte ainsi que de la présence de mucilage (Pérez-de-Luque *et al.*, 2006 ; Lozano-Baena *et al.*, 2007) (Figure 19 D). En résumé, ces mécanismes de défense précoces jouent un rôle de barrière physique afin de circonscrire la propagation des cellules du parasite dans les cellules de l'hôte et d'empêcher le parasite d'établir ses connexions vasculaires avec les cellules de l'hôte.

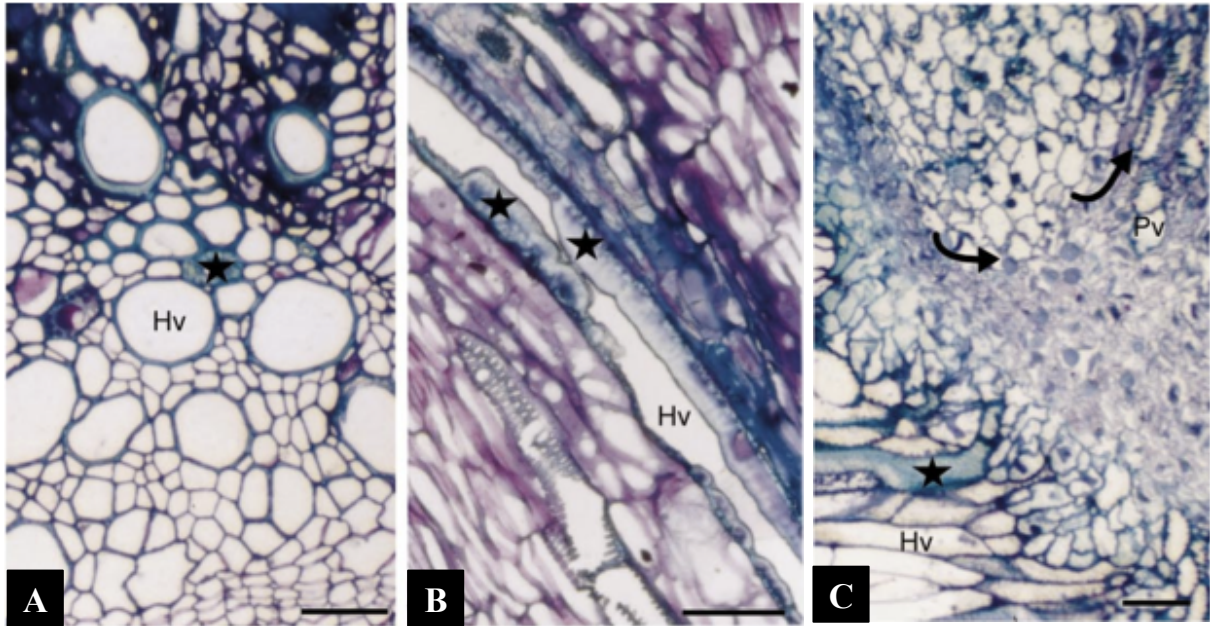


Figure 20 : Mécanismes de résistance au parasite fixé au niveau des cellules vasculaires après mise en place d'un continuum entre les vaisseaux conducteurs de l'hôte et du parasite
(A) coupe transversale de racine d'un génotype de tournesol résistant infesté par *O. cumana*. Un renforcement pariétal (★) est visible dans les vaisseaux du xylème de l'hôte (Hv) proche du point de fixation du parasite.
(B) coupe longitudinale des vaisseaux du xylème (Hv) de l'hôte dans un génotype de tournesol résistant montrant des occlusions des vaisseaux (★).
(C) l'interface hôte-parasite dans les racines d'un génotype résistant de tournesol (coupe longitudinale) : dépôts de substances types gel ou gomme sont observés dans les vaisseaux du xylème (★) (Hv) ; une désorganisation cellulaire le long des vaisseaux du parasite (Pv) (↷) (Labrousse *et al.*, 2001).

2.2.5.1.3. La résistance face aux parasites fixés

Des résistances dites tardives peuvent intervenir une fois que le parasite a réussi la connexion aux tissus vasculaires de l'hôte. Certains génotypes de pois sont résistants à *O. crenata* car leurs cellules vasculaires se remplissent de composés de mucilage qui bloquent ainsi l'approvisionnement en nutriments du parasite, induisant la nécrose progressive de celui-ci (Pérez-de-Luque *et al.*, 2006). De manière similaire dans l'interaction *O. cumana*-tournesol, des mécanismes de résistance tels que des renforcement pariétaux (lignification), des occlusions des vaisseaux conducteurs (gomme, gel) et des désorganisations cellulaires résultant de l'initiation de la nécrose de l'orobanche ont été démontrés dans les génotypes résistants par des observations histologiques à l'interface des deux partenaires (Figure 20) (Labrousse *et al.*, 2001).

Dans l'interaction tournesol-*O. cumana*, il a été montré que la sur-expression d'un gène, *HaDef1*, codant pour une défensine, est caractéristique de la résistance d'un tournesol. En effet, ce gène est fortement induit quelques jours après la fixation du parasite et quelques jours avant l'apparition de nécroses des tubercules. Le peptide recombinant, Ha-DEF1, a été produit et des tests *in vitro* ont révélé que celui-ci induit spécifiquement une mort cellulaire de l'orobanche, ce qui expliquerait la nécrose des parasites infectant le tournesol résistant (de Zélicourt *et al.*, 2007). En effet, cette défensine induit un brunissement à l'apex des procaulômes d'*O. cumana* mais aussi de *P. ramosa*, alors que ni la plante parasite *Striga hermontica*, ni la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ne sont affectées (Figure 21 page 76).

Enfin, 208 accessions de vesce (*Vicia* spp.) ont fait l'objet d'une étude sur la caractérisation et la recherche de mécanismes de résistance contre *O. crenata*. Quelques accessions de cette « core collection » ont montré une résistance assez forte face à cette orobanche. En plus des mécanismes déjà connus comme la faible induction de la germination et la difficulté d'établissement du parasite sur les racines, ils ont montré que les orobanches

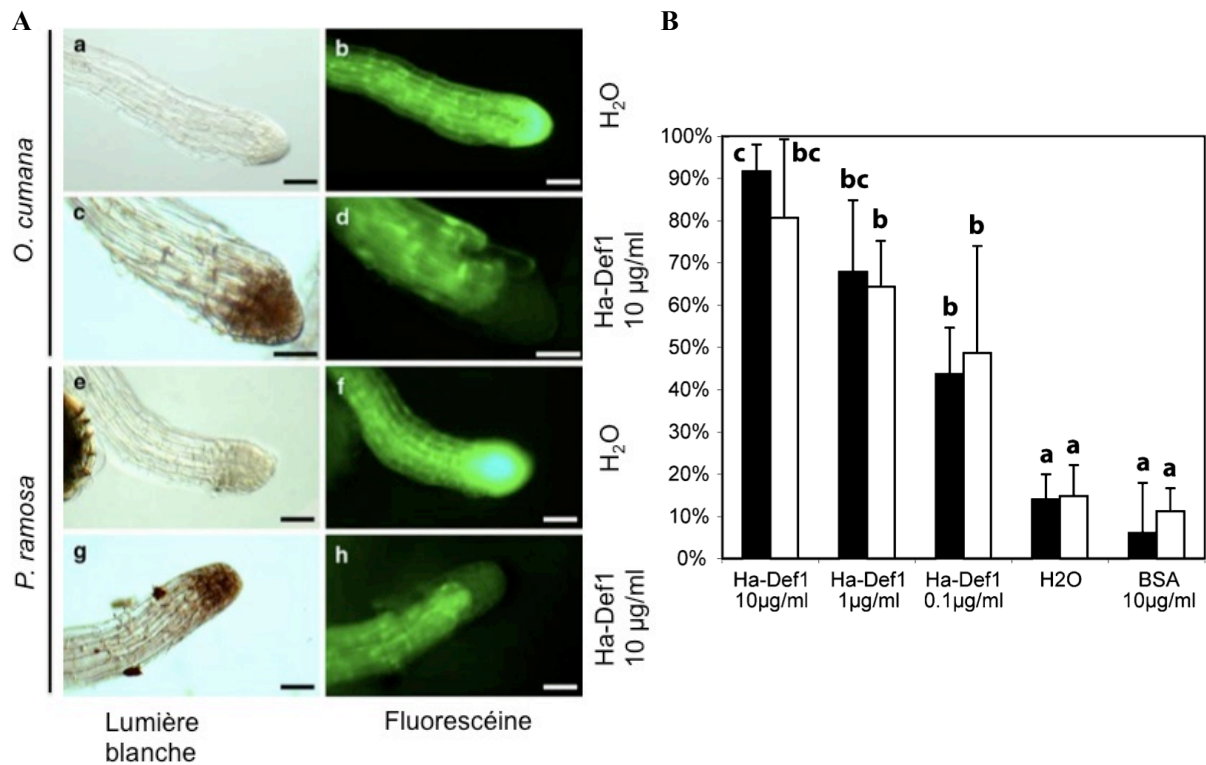


Figure 21 : (A) Effet toxique du peptide purifié Ha-Def1 provoque la nécrose de l'apex des germinations d'*O. cumana* (a-d) et de *Phelipanche ramosa* (e-f) observée en lumière blanche (a, c, e et g) et en fluorescence (b, d, f, et h) par une coloration vitale au diacétate de fluorescéine. (B) Pourcentage de plantules d'orobanches présentant des symptômes de brunissement après 24h de traitements à Ha-Def1. A différentes concentrations. *O. cumana* (en noir) et *P. ramosa* (en blanc). (de Zélicourt *et al.*, 2007).

n'émergeaient que très peu de l'ordre de 20 % par rapport aux plantes contrôles (Sillero *et al.*, 2005b). Ces résultats ont été confirmés par Fernandez-Aparicio *et al.* (2009), chez *Vicia sativa* cv. Mesquita, infestée soit par *O. crenata*, soit par *P. aegyptiaca*. La résistance de ce cultivar diffère selon l'orobanche qui l'infeste. Sa résistance contre *O. crenata* est basée sur l'induction d'un retard de croissance des tubercules fixés, alors que sa résistance contre *P. aegyptiaca* est activée plus tôt en limitant la formation des tubercules.

2.2.5.2. L'existence de gènes majeurs de la résistance

L'un des moyens les plus sûrs pour s'affranchir de la présence de l'orobanche dans les parcelles est l'exploitation de plantes résistantes. Dans le cas de la résistance à l'orobanche, aucun phénomène de réaction hypersensible n'a été observé à ce jour (Lozano-Baena *et al.*, 2007). Malgré l'absence de gènes majeurs de résistance clairement identifiés, dans le cas de l'interaction *O. cumana*-tournesol, la résistance a longtemps été développée de manière verticale en suivant la théorie gène pour gène de Flor (1956). Les premiers cultivars de tournesols résistants à l'orobanche ont été développés en 1912 et 1917 en URSS avec la mise en évidence des gènes *Or* ; mais ont été contournés dès 1925. Ceci a conduit à la notion de race chez *O. cumana* (Vranceanu *et al.*, 1980). Ainsi, de nombreuses résistances ont été développées, le gène *Or1* conférant la résistance à la race A et *Or5* résistant à la race E. Une race F contournant cependant tous les gènes de résistance connus est apparue dès 1995 en Espagne. L'étude d'une collection de germoplasmes d'*Helianthus* cultivés et sauvages a permis de révéler des espèces sauvages résistantes (*H. divaricatus* et *H. grosseserratus*) conduisant alors à la sélection de cultivars résistants à la race F. Cependant, une race G est rapidement apparue en Espagne contournant les 5 gènes *Or* connus (Molinero-Ruiz *et al.*, 2009) ainsi que les espèces résistantes à la race F (Molinero-Ruiz et Melero-Vara, 2005 ; Fernandez-Martinez *et al.*, 2005). Les gènes *Or* n'ont pas de fonction connue. Ces gènes ont

été identifiés par des travaux de cartographie génétique se basant sur l'observation des contournements des génotypes de tournesol résistants par les différentes races d'*O. cumana*. Les programmes de sélection basés uniquement sur une résistance impliquant des gènes dominants se sont donc révélés inefficaces. La résistance peut être rapidement contournée par l'émergence de nouvelles races. La résistance chez le tournesol et d'autres espèces comme chez le pois semble désormais s'orienter vers une résistance de type horizontal, faisant intervenir plusieurs QTL (quantitative trait loci) de nature multigénique (Labrousse *et al.*, 2001; Roman *et al.*, 2002b) pour compléter la résistance qualitative. Alors qu'aucune résistance gène pour gène n'a été découverte chez le genre *Orobanche*, Li et Timko (2009) ont isolé et caractérisé un gène (*RSG3-301*) conférant la résistance à *Striga gesnerioides* race 3 (SG3) chez le pois chiche par induction de nécrose. *RSG3-301*, code une protéine homologue R contenant un domaine d'interaction protéine-protéine « coiled-coil » sur l'extrémité N-terminal, un site de liaison nucléotidique (NBS), et un domaine répété riche en leucine sur l'extrémité C-terminal. Le silencing de l'expression du gène *RSG3-301* dans le cultivar de pois chiche résistant B301 mène à la sensibilité à la race 3 mais n'affecte pas la résistance aux autres races du parasite indiquant l'existence d'un mécanisme de résistance gène pour gène dans le cas de cette interaction (Li et Timko, 2009).

2.2.5.3. Aspects transcriptomiques et protéomiques de la résistance

Des mécanismes de défense sont induits quand la plante hôte reconnaît l'orobanche comme pathogène. La plante réagit alors par l'activation de voies de défense qu'il est possible d'analyser par l'étude de l'expression des gènes qui contrôlent ces voies. Chez la tomate infestée par *P. aegyptiaca*, la plante hôte reconnaît le parasite avant tout contact. En effet dès une heure après infestation de graines d'orobanches germées, une accumulation d'ARNm d'une Wall Associated Kinase débute (LeWAK), suivie de l'expression de gènes marqueurs de voies de défense comme GluB (glucanase), PGIP (Polygalacturonase inhibiting protein),

PR1. De plus, l'expression de LeWAK est régulée par des traitements à l'acide salicylique, au jasmonate et à l'éthéphon suggérant que la défense contre l'orobanche peut être médiée par les voies du SA, du JA et de l'ET avec LeWAK jouant un rôle de senseur lors de l'attaque du pathogène (Lejeune *et al.*, 2006). Dans le cas de l'interaction d'*Orobanche aegyptiaca* avec une variété de tabac sensible, le gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) mis sous le contrôle du promoteur de la protéine PR-1b, gène marqueur de la voie de l'acide salicylique, est induit au niveau des racines. Ceci suggérerait donc la mise en place de la SAR (Résistance Systémique Acquise) (Joël et Portnoy, 1998). Dans le cas de l'interaction compatible *P. ramosa* - *A. thaliana*, plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et les voies de signalisation du jasmonate (JA) et de l'éthylène (ET), sont activés dès 1h après le dépôt des graines le long des racines de l'hôte (Vieira Dos Santos *et al.* 2003a, b). Dans le cas de l'interaction *Medicago truncatula*-*Orobanche crenata*, une étude a permis d'identifier 81 gènes sur-régulés impliqués dans les voies du JA, des phénylpropanoïdes et des phytoalexines, et dans le renforcement pariétal (Die *et al.*, 2007). Des analyses transcriptomiques ont révélé lors de l'interaction tournesol-*O. cumana*, que le génotype résistant exprimait une plus forte réponse couvrant l'ensemble des voies de défense que le génotype sensible impliquant des gènes marqueurs du SA et du JA. De plus, des modifications pariétales, comme une accumulation de callose, menant au confinement du parasite ont pu être corrélées à la surexpression d'un gène codant une callose synthase HaGSL1 (Letousey *et al.*, 2007). De manière similaire, chez un autre modèle d'interaction plante-plante parasite, le pois chiche infesté par la plante hémiparasite *Striga gesnerioides*, il a été montré l'existence de gènes différentiellement exprimés chez un génotype résistant à la race SG3 de *S. gesnerioides* mais sensible à la race SG4. De 111 à 2102 gènes sont exprimés différentiellement entre 6 et 13 jours après infestation. Lors de l'interaction incompatible, des gènes impliqués dans la transduction du signal, dans le déclenchement de l'apoptose, et dans

la résistance au stress biotique et abiotique sont exprimés à 6 jai. A partir de 13 jai, les gènes surexprimés sont des gènes impliqués dans les réactions de défense des plantes et dans les mécanismes de renforcement pariétal (Huang *et al.*, 2012). Au niveau protéomique, Castillejo *et al.* (2009) ont réalisé le protéome global des racines de deux génotypes de *Medicago truncatula*, un sensible et un résistant, infestés par *O. crenata*. La plupart des protéines différentes entre les profils des deux génotypes mises en évidence par électrophorèse 2D et analyse MALDI-TOF/TOF appartiennent à des catégories de gènes impliqués dans des voies de défenses ou des voies de tolérance aux stress.

2.2.5.4. L'apport des biotechnologies dans la lutte contre les plantes parasites

L'évolution des outils biotechnologiques a permis d'envisager le développement de nouvelles approches de lutte contre les plantes parasites. Certaines toxines ont été caractérisées et se sont révélées être une stratégie efficace dans la lutte contre les plantes parasites. Ainsi, l'expression du gène codant la sarcotoxine IA, isolée de la mouche *Sarcophaga pregrin*, dans les racines de tomates induit une réduction de 50 % du nombre d'*Orobancha aegyptiaca* qui émergent (Aly *et al.*, 2006 ; Hamamouch *et al.*, 2005) ainsi qu'un rendement amélioré de 3 à 5 fois sous forte infestation comparé aux témoins non transformés (Hamamouch *et al.*, 2005).

L'interférence ARN (ARNi) (Napoli *et al.*, 1990 ; Fire *et al.*, 1998) a aussi été exploitée dans le cadre de la lutte contre l'orobanche. Cette technique repose sur la transformation d'une plante hôte par une construction contenant de petites séquences double brin d'ARN ciblant spécifiquement un gène impliqué dans le développement du parasite. La translocation du signal ARNi via l'*haustorium* dans le parasite doit en théorie inhiber spécifiquement l'expression du gène cible pour provoquer un dysfonctionnement du

développement du parasite voire sa mort. Tomilov *et al.* (2008) ont montré, grâce à l'inhibition de la transcription du gène GUS (β -glucuronidase) introduit dans le parasite *Triphysaria versicolor*, que les petits ARN produits par l'hôte *A. thaliana* sont bien transférés de l'hôte vers le parasite et qu'ils ne sont pas bloqués à l'interface des deux partenaires. Aly *et al.* (2009) ont généré des plants transformés de tomate contenant une séquence ARNi dirigée contre la M6PR (Mannose-6-phosphate reductase) d'*Orobanche aegyptiaca*. Cette protéine est requise pour la biosynthèse du mannitol qui serait impliqué dans l'établissement d'un pont osmotique entre l'hôte et le parasite (Simier *et al.*, 1994 ; Delavault *et al.*, 2002). Cette étude montre la réduction significative du taux de transcrits M6PR et une baisse de la quantité de mannitol dans l'orobanche. Conjointement, il est observé une hausse de la mortalité des orobanches de l'ordre de 20 fois supérieure à celle des orobanches infestant des tomates non transformées.

2.2.5.5. Développement d'une lutte intégrée contre les plantes parasites

Les mécanismes de résistance à l'orobanche sont variés, ils vont de l'inhibition de la germination de la graine à l'induction de la nécrose du parasite. Les programmes de sélection s'orientent donc vers la sélection de caractères quantitatifs venant appuyer les traits qualitatifs dans une optique de durabilité de la résistance. Cette démarche est appuyée par les progrès des biotechnologies qui permettent de caractériser et d'exploiter rapidement des gènes d'intérêt impliqués dans la résistance. Cependant ces progrès ne doivent pas primer sur une gestion raisonnée de la culture et d'une gestion intégrée de la lutte contre les plantes parasites.

La gestion des plantes parasites est assez complexe à mettre en œuvre en comparaison des autres agents pathogènes. En effet quand l'utilisation de traitements phytosanitaires est largement efficace et employée pour d'autres cultures, le cycle et l'intimité du développement de l'orobanche sur son hôte complexifie la stratégie à adopter. De plus les récents recentrages

politiques concernant l'environnement notamment en Europe demandent aux acteurs des filières agricoles de raisonner les méthodes de lutte et l'utilisation de produits chimiques phytosanitaires dont le catalogue ne cesse de faire l'objet de suppression de matières actives. La complexité du modèle des plantes parasites en fait un bon exemple pour envisager le développement d'une approche intégrée de lutte. A l'heure actuelle la stratégie qui montre le plus d'efficacité est l'utilisation de cultivars résistants combinée à un herbicide et à l'arrachage manuel des plantes parasites. En l'absence de cultivars résistants, l'approche herbicide/arrachage manuel est la seconde stratégie employée. C'est donc la combinaison de trois approches qui permet de limiter les dégâts sur les cultures quand le diagnostic et le déclenchement des traitements ont été faits à temps. Dans un futur proche la lutte intégrée devrait prendre de l'ampleur et les méthodes se multiplier. Le schéma idéal qui se dessine est l'utilisation de « cultivars résistants-herbicide », sur lequel viendront se greffer l'utilisation d'auxiliaires de cultures (insecte et/ou champignon). La préparation des parcelles sera un critère très important à prendre en compte. En « pré-implantation » de culture la réalisation d'un traitement de fond du sol pour limiter le nombre de graines viables dans le sol, l'entretien des bordures de parcelles et la gestion des adventices hôtes ou faux hôtes ou l'implantation de jachères récoltées avant le terme du cycle de l'orobanche. La multiplication des précautions avant l'installation d'une culture est le seul moyen pour limiter les pertes de cultures.

3. Objectifs de la thèse

Le colza d'hiver (*Brassica napus*) est la première culture oléagineuse en Europe et sa production ne cesse d'augmenter depuis 2005 surtout en France, en Allemagne et dans les pays de l'Est. En plus des agents pathogènes communs rencontrés sur le colza tels que les insectes ou les champignons, l'orobanche rameuse est devenue un problème phytosanitaire

majeur surtout dans l'ouest de la France depuis une dizaine d'années, causant de sévères pertes de rendement dans les champs les plus infestés (Gibot-Leclerc *et al.*, 2001). Les premiers constats réalisés sur colza datent des observations de Sobrino-Vesperinas *et al.* (1982) en Espagne. Ceci montre à quel point ce problème est alarmant. Récemment les compagnies semencières ont enregistré des cas sérieux croissants d'infestation de parcelles de colza dans les autres pays européens en raison de l'expansion de cette culture (Allemagne, Bulgarie et Grèce) et de l'absence de méthodes de lutte efficaces (Shindrova et Kostov, 2009; Tsialtas et Eleftherohorinos, 2011).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes proposés de caractériser le comportement de différents génotypes de colzas vis-à-vis de l'orobanche. Ces caractérisations ont pour but de sélectionner des génotypes à bon comportement utilisables dans des programmes de sélection orientés sur la résistance vis-à-vis de l'orobanche rameuse. Dans un second temps, ont été réalisées des études visant à évaluer l'effet de molécules SDN (Stimulateur des Défenses Naturelles des plantes) sur l'interaction entre le colza et *P. ramosa*. D'une part, la réponse transcriptomique de racines de colza traitées par application foliaire de BTH a été analysée afin d'identifier d'éventuelles inductions de mécanismes de défense qui pourraient être exploités dans le développement de génotypes résistants par des approches biotechnologiques. D'autre part, une étude a été menée sur l'effet d'un traitement à la laminarine (extrait d'algue marine) sur colza infesté afin d'évaluer l'intérêt de l'utilisation d'une telle molécule dans la lutte contre *P. ramosa* par les agriculteurs au champ.

Dans une première partie seront exposés les travaux effectués sur le criblage des différents génotypes de colzas, puis dans une seconde partie, sur l'emploi de molécules SDN sur l'interaction colza-orobanche et leurs effets.

*Chapitre 2 : Etude du comportement de
génotypes de colza vis-à-vis de P. ramosa*

Tableau IV: Génotypes de colza testés et fournisseurs

Génotype	Entreprise / obtenteur	Réponse au champ face à <i>P. ramosa</i> *
Adriana	Advanta	++
Alesi	KWS maïs (France)	+
Aviso	Advanta	+
Campo	Dekalb	-
Cooper	Advanta	++
Darmor	INRA	nd
Expert	Momont	nd
Grizzly	RAGT semences	-
Shakira	Maïsadour semences	-
Yudal	INRA	nd

* Impact de l'infestation sur le développement global du colza et le rendement grainier évalué lors des saisons 2007 à 2011. -, pas d'impact significatif ; +, impact modéré ; ++, fort impact ; nd, non déterminé (CETIOM)

CHAPITRE 2 - Etude du comportement de géotypes de colza vis-à-vis de *P. ramosa*

Du fait de l'expansion récente de l'orobanche rameuse dans les champs de colza, il existe peu d'informations disponibles sur la résistance de cette culture à ce parasite. C'est pourquoi, l'une des missions du CETIOM consiste à évaluer le comportement de lignées de colza disponibles sur le marché vis-à-vis de *P. ramosa* dans des zones fortement infestées. Dans ces expérimentations au champ, il s'avère que toutes les lignées sont parasitées par des orobanches au moment de la récolte. Cependant parmi ces géotypes, des comportements contrastés ont été observés tant au niveau du développement de la plante que du rendement des graines (Comm. Pers., CETIOM.). Cette variabilité pourrait être due à des caractères de résistance et/ou de tolérance ce qui est prometteur pour le développement de programmes de sélection chez le colza. Des co-cultures ont été réalisées en pots en serre et en conditions hydroponiques. Ces dernières ont été utilisées afin de suivre au cours du temps l'évolution de l'interaction entre le colza et *P. ramosa*. Cette technique a été éprouvée pour d'autres interactions impliquant le tournesol et *Orobanche cumana* (Labrousse *et al.*, 2001) ou la tomate et *Phelipanche aegyptiaca* (El Almouch *et al.*, 2006) et a permis d'identifier des géotypes résistants qui ont été utilisés pour caractériser des mécanismes de résistance. Basé sur ce constat, ce modèle a été développé pour étudier l'interaction entre le colza et *P. ramosa*. Les travaux de criblage réalisés lors de cette étude ont eu pour but d'identifier et de caractériser les composantes de la résistance des géotypes de colza présentant un comportement contrasté au champ vis-à-vis de l'orobanche rameuse.

Tableau V : Composition du milieu de culture Coic 50 %(d'après Coïc et lesaint, 1975)

Macroéléments		Microéléments	
	mM		μM
KNO ₃	3,8	FeCl ₃	3,7
K ₂ HPO ₄	0,3	ZnSO ₄ + 7H ₂ O	3,5
KH ₂ PO ₄	0,8	BO ₃ H ₃	24,3
NaNO ₃	0,2	MnSO ₄ + H ₂ O	11,8
NH ₄ NO ₃	2	CuSO ₄ + 5H ₂ O	1
Ca(NO ₃) ₂ + 4H ₂ O	3,1	Na ₂ MoO ₄ + 2H ₂ O	0,04
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0,75		
NaCl	0,2		

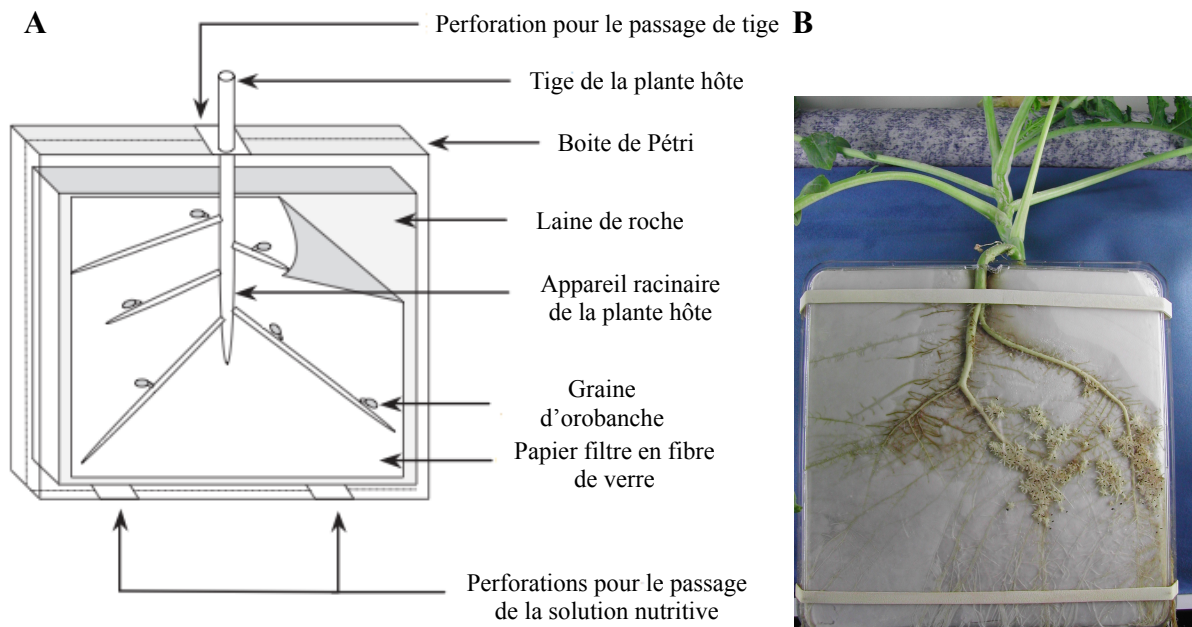


Figure 22 : (A) schéma du montage en hydroponie utilisé pour les co-cultures avec l'orobanche (Labrousse *et al.*, 2004) ; (B) photographie du montage en hydroponie présentant une co-culture colza-*P. ramosa*.

1. Matériel & méthodes

1.1. Matériel végétal

Les graines de *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel « type 1 » ont été collectées sur des hampes florales infectant des parcelles de colza (génotype Licorne) en Poitou-Charentes en 2007 (St Martin de Freigneau). Les graines sont stockées à l'obscurité à 25°C. Les dix génotypes de colza étudiés ont été fournis par des entreprises semencières, l'INRA et le CETIOM (Tableau IV page 92). Sur ces 10 lignées, 8 ont été sélectionnées pour leur comportement contrasté face à une infestation par l'orobanche rameuse basé sur un relevé de leur tolérance au champ depuis 2007 (CETIOM). Les lignées Darmor et Yudal sont deux génotypes étudiés au laboratoire et utilisés respectivement comme témoin résistant et sensible (Véronési *et al.*, 2006 ; 2009).

1.2. Co-cultures en système hydroponique en chambre de culture

Les graines de colza et d'orobanche rameuse sont stérilisées par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel 12%) pendant 5 minutes et rincées 3 fois 5 minutes puis 3 fois une minute à l'eau distillée stérile.

Pour les graines de colza, une douzaine de graines sont déposées entre 2 feuilles de papier filtre dans des boîtes de Petri de Ø 19 cm scellées avec du parafilm. Les boîtes sont placées pendant 7 jours à 23°C, $300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ radiations actives photosynthétiques avec une photopériode de 16h/8h lumière/obscurité. Les plantules sont ensuite transférées dans des boîtes de Petri carrées de 25x25 cm sur une feuille de papier filtre superposée à une couche de laine de roche et fertilisées par une solution minérale Coïc à 50% (Coïc et Lesaint, 1975) (Tableau V) et cultivées pendant 4 semaines avant l'infestation par les graines d'orobanche. L'inoculation est réalisée par dépôt de graines d'orobanche conditionnées ou prégermées

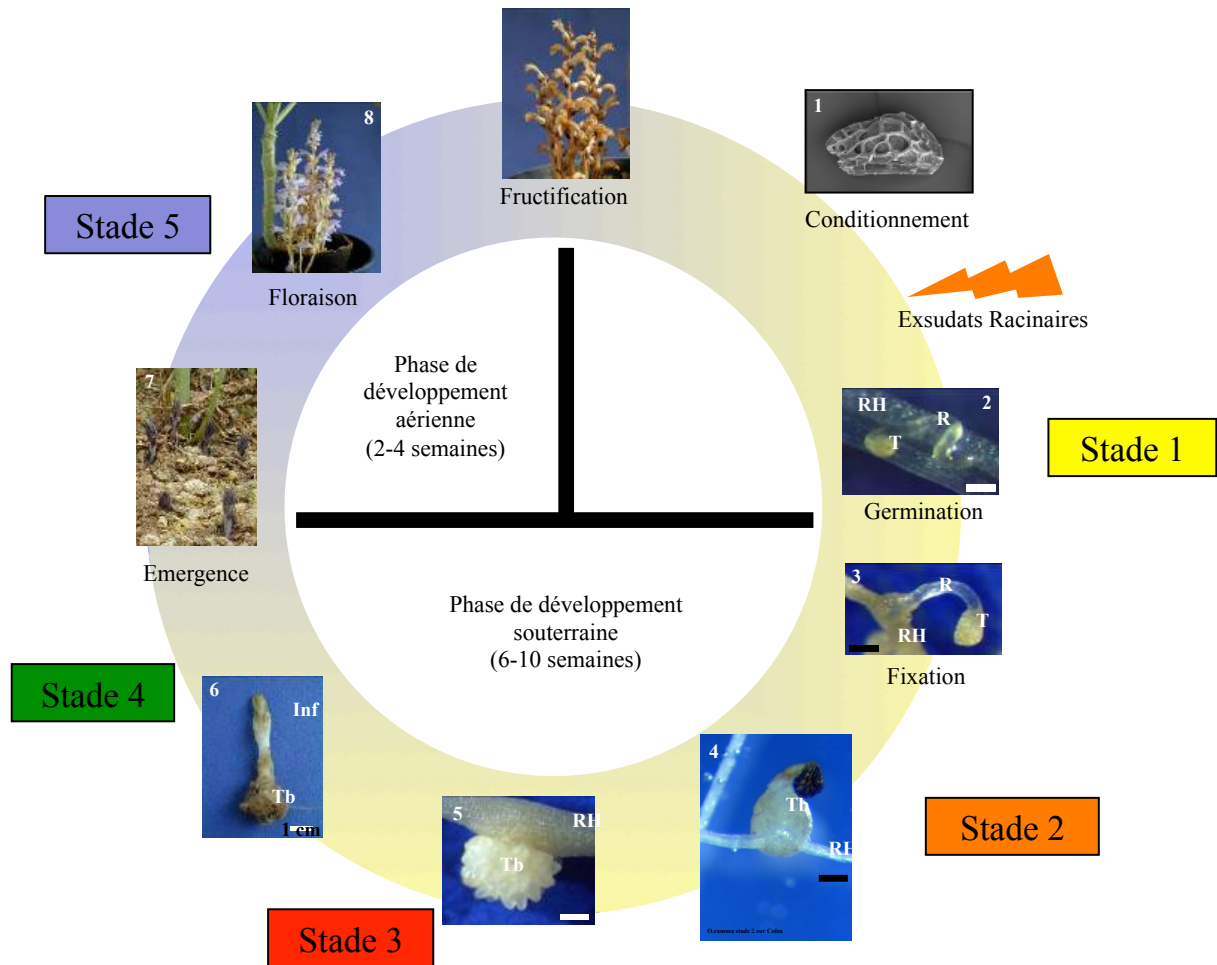


Figure 23 : Stades de développement de *P. ramosa* au cours de son cycle de vie.
 RH : racine de la plante hôte ; T : tégument ; R : radicule ou procaulôme ; Tb : tubercule ;
 inf : inflorescence.

(20 mg de graines sèches/boîte pour une densité de 15 orobanches/cm²) sur le papier filtre à moins de 5 mm des racines de l'hôte (Figure 22 page 94).

Avant d'être inoculées, les graines d'orobanche stérilisées sont conditionnées sur une feuille de papier filtre en boîte de Pétri pendant 7 jours à l'obscurité à 23 °C. Cette étape a pour but de rendre apte les graines à percevoir le signal qui leur permettront de germer. L'induction de la germination des graines conditionnées est faite soit naturellement par les exsudats racinaires de l'hôte soit par l'ajout de GR24 à une concentration optimale de 3.10⁻⁸M (Johnson *et al.*, 1976). Après 30 heures de traitement au GR24 les graines d'orobanche sont rincées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de GR24, puis elles sont déposées le long des racines des plants de colza.

Le taux de germination des graines d'orobanche à proximité des racines est déterminé à 12, 19, 26 et 33 jours après l'infestation. Le pourcentage est déterminé par comptage d'au moins 400 graines par boîte sous microscope optique (Olympus Optical, Tokyo, Japan), grossissement x30. L'évolution du développement des orobanches fixées en tubercules est suivie pendant 75 jours après infestation (jai) des systèmes racinaires. La notation de l'évolution de la croissance des tubercules est réalisée en suivant la classification de Labrousse *et al.* (2001) (Figure 23) :

Stade 1 : graine d'orobanche germée et début de fixation sur l'appareil racinaire de l'hôte,

Stade 2 : graine d'orobanche fixée et formation d'un petit tubercule,

Stade 3 : apparition de racines adventives sur le tubercule, appelé stade « araignée »,

Stade 4 : bourgeon apical visible sur le tubercule ($\geq 1,5$ mm longueur) et début de formation de la hampe florale,

Stade 5 : hampe florale portant des fleurs.



Figure 24 : Expérience de criblage en serre des génotypes de colza vis-à-vis de l'orobanche (LBPV, M Gauthier)

Soixante-quinze jours après infestation, les racines sont récoltées et débarrassées des tubercules d'orobanche, séchées une nuit à 80°C puis pesées. Le nombre total d'orobanches fixées est ainsi rapporté à la masse sèche de racine (Nb tubercules/g MS).

1.3. Co-cultures en pot en serre

En se basant sur les résultats en système hydroponique, la détermination des comportements des géotypes de colza a été complétée par un criblage en serre en pot pour se rapprocher des conditions de plein champ (Figure 24). Cinq mg de graines d'orobanche sont mélangés dans un mélange tourbe-sable-argile (1:1:1 vol) dans des Jiffy pots de 400 cm³ eux même placés dans un pot de 1,3 L ne contenant pas de mélange infesté. Le conditionnement des graines d'orobanche est alors effectué par recouvrement des pots d'une bâche opaque, l'ensemble étant placé à la lumière pendant 1 semaine à 23°C. Trois graines de colza sont ensuite semées directement dans chaque pot. Après 4 semaines de culture, les plantules sont éclaircies pour n'en laisser qu'une dans chaque pot. Les plants sont cultivés à 23±5 °C avec 300 μmol m⁻² sec⁻¹ PAR et une photopériode de 16h d'alternance lumière/obscurité. Les plants de colza sont fertilisés par une solution commerciale de « lycoplant bleu» 3 ‰ (Plantin, Courthéson, France) une à 2 fois par semaine. Après 3 mois et demi de co-culture, les plants de colza sont retirés des pots et leur systèmes racinaires sont nettoyés, séchés à 80 °C pendant 48h et pesés après avoir détaché, dénombré et annoté les orobanches fixées. Le nombre total de tubercules d'orobanche est exprimé par gramme de matière sèche de racine du colza. Tout au long de la culture, les émergences des hampes florales ainsi que la date moyenne d'émergence ont été annotées.

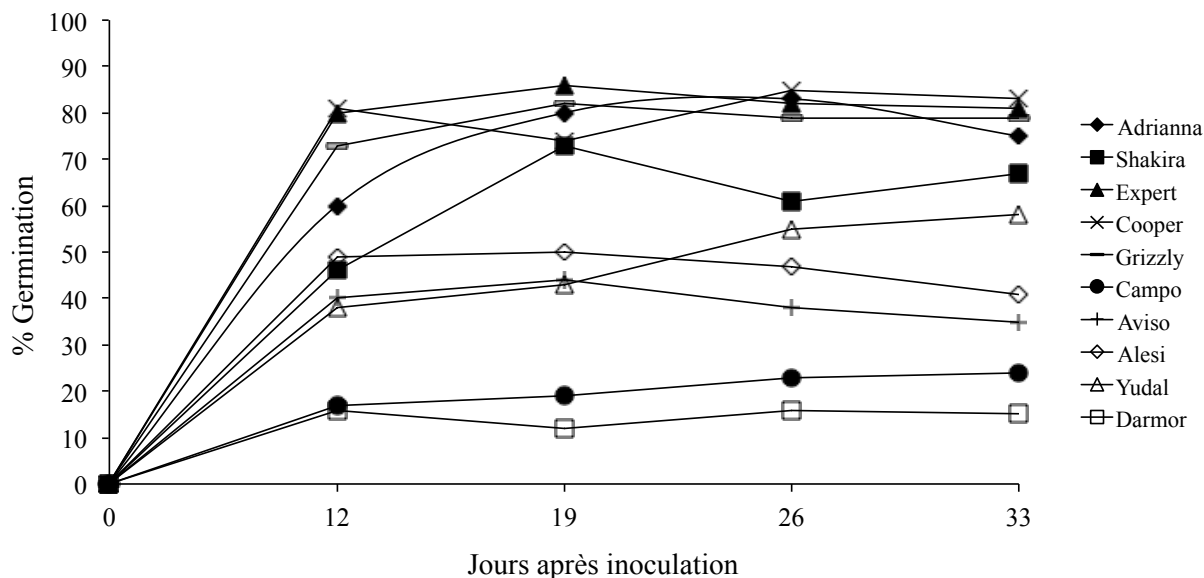


Figure 25 : Cinétique du taux de germination lors de l'interaction *B. napus* – *P. ramosa* obtenue lors des expérimentations en hydroponie.

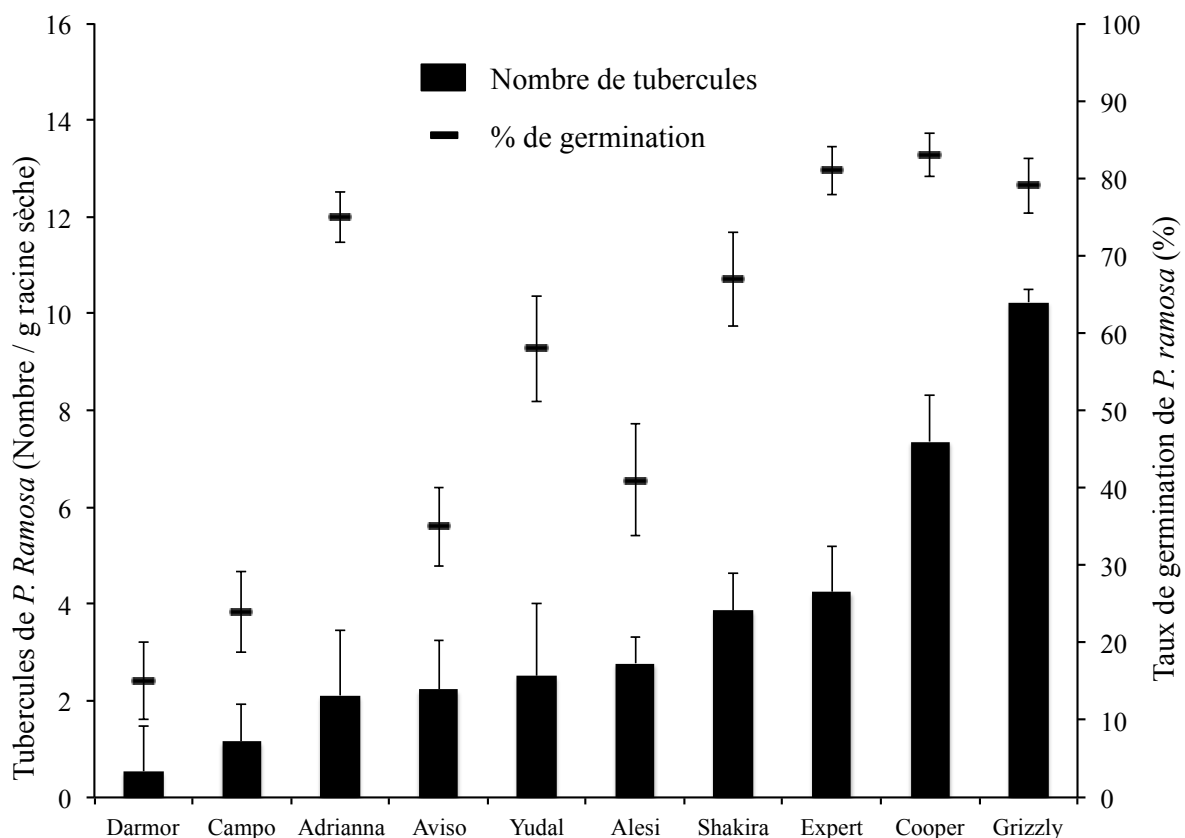


Figure 26 : Taux de germination des graines de *P. ramosa* (33 jours après infestation) et nombre de tubercules fixés / gramme de matière sèche de racine (75 jai) obtenus dans les expérimentations hydroponiques pour 10 génotypes de colza. Les résultats représentent la moyenne (n=20) et les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95 %.

1.4. Analyses statistiques

Deux expériences ont été réalisées avec chacune 10 plants par génotype de colza. L'analyse statistique a été réalisée sur les données combinées d'expériences répétées. Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée sur le nombre d'orobanches fixées ou émergées grâce au logiciel R (<http://www.R-project.org/>) et le package Rcmdr (<http://CRAN.R-project.org/package=Rcmdr>), avec les génotypes et le traitement GR24 comme facteurs. Les différences significatives entre les moyennes ont été déterminées par un test de Tukey à $P < 0,05$. La normalité des données ainsi que l'homogénéité de la variance ont été préalablement confirmées.

2. Résultats

2.1. Résistance du colza et induction de la germination

L'utilisation du système hydroponique permet d'étudier et de caractériser de manière précise l'interaction *B. napus* - *P. ramosa*, depuis l'induction de la germination des graines du parasite jusqu'au développement de hampes florales caractéristiques d'un stade de développement avancé. L'étude de l'interaction a débuté par l'étude de l'induction de la germination des graines de *P. ramosa* par chacun des génotypes de colza testés (Figure 25). L'évaluation hebdomadaire du taux de germination au voisinage des racines du colza (± 1 cm), révèle que le maximum de germination est atteint quel que soit le génotype aux alentours du douzième jour après l'infestation des systèmes racinaires. Cependant, les génotypes de colza diffèrent par leur capacité à induire la germination des graines d'orobanche et par le nombre de tubercules qu'ils supportent. Ainsi, le taux de germination 33 jai varie de $15,0 \pm 7,0$ % pour Darmor à $83,0 \pm 4,0$ % pour Cooper (Figure 26). Les génotypes de colza peuvent donc être classés selon leur capacités à induire la germination : faiblement stimulateurs (Darmor et Campo), moyennement stimulateurs (Aviso, Alesi, Yudal et Shakira) et fortement

stimulateurs (Adriana, Grizzly, Expert et Cooper). De la même manière, le nombre de tubercules supportés varie largement entre les génotypes testés : Darmor supporte en effet peu d'orobanches $0,5 \pm 0,3$ tubercules/g MS de racine comparé aux $10,2 \pm 1,5$ tubercules/g MS de racine pour un génotype tel que Grizzly. A première vue, il semblerait donc que plus l'induction de la germination des graines d'orobanche est élevée plus il y a de fixations d'orobanche sur le système racinaire des génotypes de colza. Par exemple, Darmor qui est le génotype le moins inducteur présente le plus faible nombre de tubercules. Inversement, Grizzly, qui est un des génotypes qui induit le plus fortement la germination du parasite, est aussi celui qui est le plus sévèrement infesté. Cependant, il n'existe pas de corrélation parfaite entre ces deux paramètres que sont la stimulation de la germination et le nombre de tubercules supportés. En effet, alors que Expert et Adriana stimulent la germination des graines d'orobanche de manière sensiblement équivalente à Grizzly ($81 \% \pm 5$ et $75 \% \pm 4$), ils sont significativement moins infestés ($4,2 \pm 1,3$ et $2,1 \pm 0,9$ tubercules/g MS de racines). Ainsi donc, bien que la capacité des génotypes de colza à induire la germination des graines d'orobanche soit une composante très importante dans l'établissement de l'interaction, plusieurs autres paramètres sont à prendre en compte dans le succès de la fixation des orobanches sur le colza.

2.2. Résistance du colza par obstacle à la fixation du parasite

D'après les résultats précédents, il semble que des mécanismes de résistance à la fixation existent chez certains génotypes, ceux-ci étant cependant partiellement masqués par le taux de germination variable entre ces génotypes. Aussi, dans le but d'évaluer uniquement la capacité des racines à être infestées par *P. ramosa*, ce paramètre d'infestation a été testé en s'affranchissant de la capacité d'induction de la germination des génotypes et ce par l'application de graines d'orobanche prégermées au GR24. Cette expérience a été réalisée sur

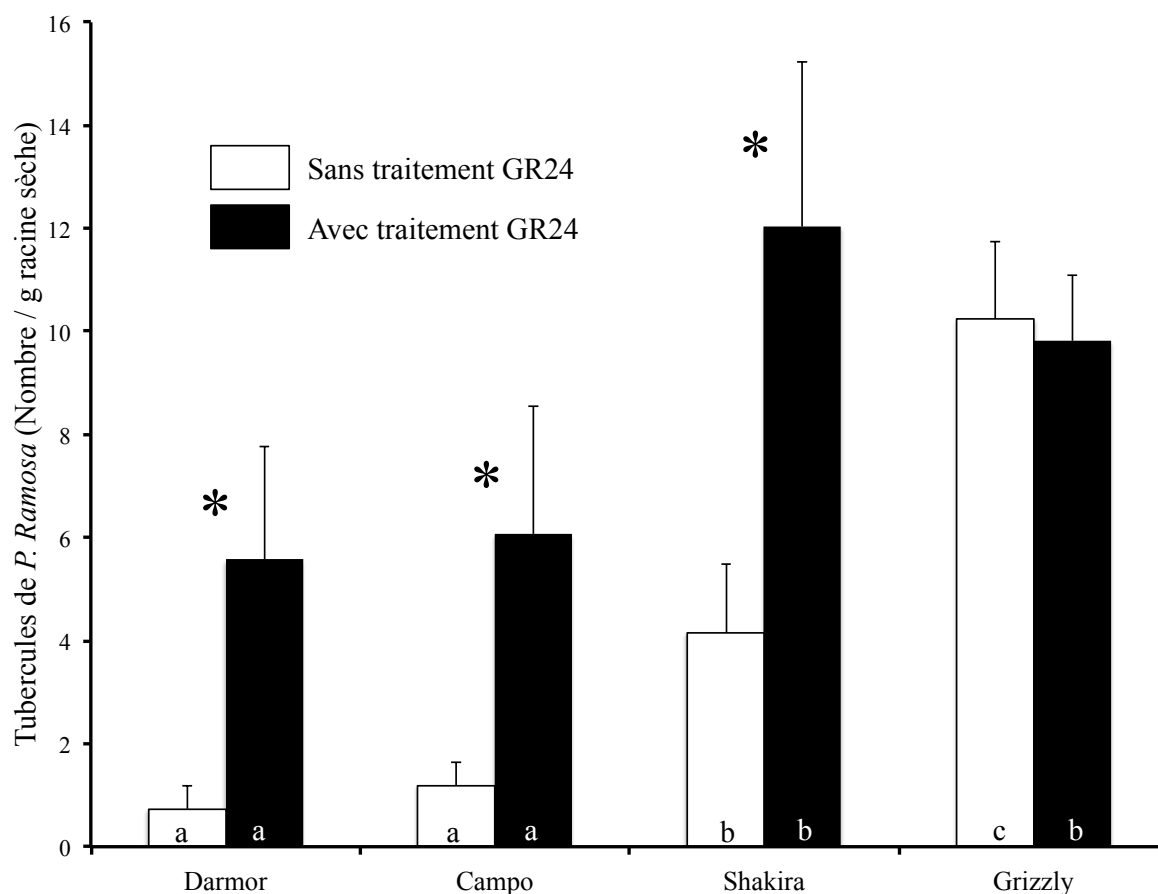


Figure 27 : Nombre de tubercules de *P. ramosa* fixés sur quatre génotypes de colza par gramme de matière sèche (75 jai) en condition hydroponique. Graines de *P. ramosa* : graines préconditionnées (Barres blanches) et graines prégermées par un traitement au GR24 (Barres noires). Les données sont des moyennes et les lignes représentent l'erreur standard. Pour un génotype donné, les astérisques indiquent que les valeurs sont significativement différentes entre les deux conditions (Test de Tukey, $P < 0,05$). Pour une même condition, les génotypes présentant la même lettre ne sont pas significativement différents (Test de Tukey, $P < 0,05$).

4 géotypes présentant en conditions hydroponiques des capacités d'induction de la germination contrastées à 33 jours : Darmor ($14,6 \pm 7,2$ %), Campo ($24,1 \pm 7,6$ %), Shakira ($67,5 \pm 7,8$ %) et Grizzly ($79,4 \pm 5,1$ %) (Figure 27). Le taux de germination obtenu avec le GR24 était de l'ordre de 85 %. Pour Grizzly, le nombre de tubercules produits à partir de graines conditionnées et prégermées n'est pas statistiquement différent ($10,2 \pm 1,5$ vs $9,8 \pm 1,29$ tubercules/g MS de racine). Ce résultat est cohérent puisque le taux de germination induit par Grizzly ($79,4 \pm 5,1$ %) est similaire au taux de germination obtenu avec le GR24 (85 %). Par conséquent, il n'y a pas de modification de la pression parasitaire. Au contraire, pour Darmor, Campo et Shakira, le nombre d'orobanches fixées varie fortement entre les deux conditions (Darmor : $0,7 \pm 0,5$ vs $5,6 \pm 2,3$; Campo : $1,2 \pm 0,5$ vs $6,1 \pm 2,5$ et Shakira : $4,2 \pm 1,3$ vs $12,0 \pm 3,2$ tubercules/g MS de racine). Ceci indique que le nombre d'orobanches augmente significativement avec une induction artificielle de la germination et donc une forte pression parasitaire. Cependant, dans ces conditions, des différences significatives du degré d'infestation sont observées entre les géotypes testés. En effet, Shakira ($12 \pm 3,2$ tubercules/g MS de racine) et Grizzly ($9,8 \pm 1,3$ tubercules/g MS de racine) supportent près de deux fois plus de tubercules que Darmor ($5,6 \pm 2,2$ tubercules/g MS de racine) et Campo ($6,1 \pm 2,5$ tubercules/g MS de racine) (Figure 27). Ainsi, pour une même pression parasitaire, le nombre de tubercules varie selon le géotype suggérant l'existence de mécanismes de résistance empêchant la fixation des orobanches.

2.3. Résistance du colza par induction d'un retard de développement

Les cinétiques de développement des tubercules de *P. ramosa* sur les systèmes racinaires des 10 géotypes de colza ont été suivies afin d'identifier des composantes de la résistance après la fixation du parasite. Pour cela, la notation hebdomadaire de l'évolution du nombre d'orobanches fixées et de leur développement a été réalisée pendant 75 jai

Tableau VI : Cinétiques de développement des tubercules de *P. ramosa* sur colza en co-cultures hydroponiques.

Jai	Stade*	Grizzly	Cooper	Expert	Shakira	Alesi	Yudal	Aviso	Adriana	Campo	Darmor
12	1	15.6 ± 5.8	11.8 ± 8.6	4.3 ± 2.4	3.3 ± 3.1	3.0 ± 3.9	1.7 ± 1.2	4.5 ± 3.9	3.0 ± 1.8	0.5 ± 0.5	0
	2	3.5 ± 3.9	1.0 ± 1.7	1.3 ± 1.4	0	0.7 ± 1.6	0.5 ± 1.2	0.7 ± 1.0	2.3 ± 1.9	0	0
	3	0.1 ± 0.4	0	0.1 ± 0.4	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nbre. tubercules/plant**		19.3 ± 8.4 ^c	12.8 ± 8.0 ^c	5.6 ± 3.3 ^b	3.3 ± 3.1 ^{ab}	3.7 ± 5.3 ^{ab}	2.2 ± 2.1 ^{ab}	5.2 ± 4.0 ^b	5.3 ± 2.4 ^b	0.5 ± 0.5 ^a	0 ^a
19	1	5.9 ± 3.4	5.0 ± 2.5	1.5 ± 0.9	4.7 ± 2.3	2.3 ± 3.3	1.0 ± 1.3	1.3 ± 1.4	2.8 ± 1.5	0.7 ± 0.5	0
	2	24.4 ± 4.4	17.2 ± 12.6	8.9 ± 5.2	6.5 ± 3.7	4.5 ± 5.5	3.2 ± 3.1	4.3 ± 3.9	3.3 ± 3.1	0.5 ± 1.2	0.3 ± 0.5
	3	13 ± 8.1	4.2 ± 4.4	8.5 ± 5.1	1.3 ± 1.8	2.3 ± 3.0	0.2 ± 0.4	1.5 ± 1.2	3.0 ± 2.1	0	0
	4	0	0	0.3 ± 0.5	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nbre. tubercules/plant**		43.3 ± 10.3 ^d	26.3 ± 15.9 ^c	19.1 ± 10.1 ^{bc}	12.5 ± 5.5 ^b	9.2 ± 11.5 ^{ab}	4.3 ± 2.6 ^{ab}	7.2 ± 4.2 ^b	9.2 ± 5.7 ^b	1.2 ± 1.5 ^a	0.3 ± 0.5 ^a
26	1	4.0 ± 2.4	2.7 ± 2.9	1.0 ± 0.9	3.3 ± 2.3	2.2 ± 2.7	0.2 ± 0.4	1.2 ± 1.2	2.0 ± 1.3	0.7 ± 0.5	0.1 ± 0.4
	2	6.8 ± 2.3	16.5 ± 5.3	2.1 ± 1.6	5.0 ± 3.4	2.3 ± 3.0	4.0 ± 2.2	3.5 ± 5.5	1.5 ± 2.1	1.0 ± 1.7	0.1 ± 0.4
	3	37.0 ± 12.6	22.0 ± 15.1	13.5 ± 7.8	9.3 ± 3	6.7 ± 7.2	6.7 ± 5.2	4.7 ± 4.3	6.5 ± 5.1	0.8 ± 1.6	0.4 ± 0.8
	4	0.4 ± 1.1	0	4.6 ± 6.6	0	0.5 ± 0.5	1.7 ± 3.1	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nbre. tubercules/plant**		48.1 ± 10.4 ^c	41.2 ± 17.6 ^c	21.3 ± 11.3 ^b	17.7 ± 6.2 ^b	11.7 ± 12.4 ^b	12.5 ± 6.7 ^b	9.7 ± 6.3 ^b	10.2 ± 6.0 ^b	2.5 ± 3.1 ^a	0.7 ± 1.0 ^a
33	1	3.6 ± 2.4	2.5 ± 2.6	1.0 ± 0.9	3.2 ± 2.6	1.7 ± 2.1	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.0	1.7 ± 1.0	0.7 ± 0.5	0.4 ± 0.8
	2	4.4 ± 1.6	1.7 ± 1.6	0.9 ± 1.0	3.7 ± 2.0	1.3 ± 1.2	1.3 ± 1.2	2 ± 2.5	0.8 ± 0.8	0.7 ± 1.2	0
	3	38.9 ± 9.5	32.2 ± 15.2	9.1 ± 5.6	11.3 ± 3.6	9.8 ± 10.3	8.5 ± 5.9	7.3 ± 4.7	8.2 ± 5.4	1.8 ± 2.2	0.7 ± 1.1
	4	2.9 ± 2.6	9.2 ± 6.5	12.3 ± 12.5	0.7 ± 0.8	1.3 ± 1.2	3.7 ± 3.8	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.8	0.4 ± 0.8
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nbre. tubercules/plant**		49.8 ± 9.2 ^d	45.5 ± 17.1 ^d	23.3 ± 11.4 ^c	18.8 ± 5.5 ^{bc}	14.2 ± 13.1 ^b	13.7 ± 6.2 ^{bc}	10.5 ± 6.9 ^b	11.0 ± 5.6 ^b	3.5 ± 3.4 ^{ab}	1.6 ± 1.5 ^a
40	1	3.4 ± 2.6	2.3 ± 3.0	1.0 ± 0.9	3.0 ± 2.4	1.8 ± 2.4	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.0	1.5 ± 1.2	0.7 ± 0.5	0.4 ± 0.8
	2	2.6 ± 1.7	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	2.0 ± 2.4	1.7 ± 1.6	0.3 ± 0.8	1.5 ± 2.7	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.8	0
	3	38.6 ± 9.8	32.2 ± 15.1	9.5 ± 5.7	12.3 ± 3.5	5.0 ± 4.4	3.2 ± 2.4	3.7 ± 2.3	7.8 ± 5.6	2.5 ± 2.1	1.0 ± 1.5
	4	5.3 ± 3.2	12.2 ± 6.1	12.9 ± 12.7	1.7 ± 1.4	6.7 ± 8.4	10.3 ± 6.7	5.7 ± 4.7	1.5 ± 1.4	0.8 ± 1.3	0.6 ± 1.1
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nbre. tubercules/plant**		49.9 ± 9.5 ^d	46.8 ± 16.6 ^d	23.6 ± 11.4 ^c	19.0 ± 5.5 ^{bc}	15.2 ± 14.0 ^b	14.0 ± 6.1 ^{bc}	11.7 ± 6.2 ^b	11.3 ± 5.3 ^b	4.5 ± 4.0 ^{ab}	2.0 ± 1.6 ^a
47	1	3.1 ± 2.4	2.3 ± 3.0	1.0 ± 0.9	2.8 ± 2.8	1.7 ± 2.1	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.0	1.5 ± 1.2	0.7 ± 0.5	0.4 ± 0.8
	2	2.9 ± 1.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	2.0 ± 2.4	1.5 ± 1.4	0.3 ± 0.8	1.3 ± 2.8	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.8	0
	3	20.3 ± 10.7	6.0 ± 9.1	5.4 ± 5.1	13.0 ± 2.8	4.3 ± 3.5	1.3 ± 2.4	4.2 ± 2.2	9.0 ± 5.3	1.8 ± 1.8	1.0 ± 1.5
	4	25.1 ± 10.2	38.3 ± 12.8	17.9 ± 12.3	2.0 ± 1.3	7.7 ± 9.6	12.5 ± 6.7	5.8 ± 4.8	1.2 ± 0.8	2.3 ± 2.6	0.6 ± 1.1
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nbre. tubercules/plant**		51.4 ± 11.2 ^d	46.8 ± 16.4 ^d	24.5 ± 11.3 ^c	19.8 ± 5.1 ^{bc}	15.2 ± 14.0 ^b	14.3 ± 6.8 ^{bc}	12.2 ± 5.9 ^b	12.0 ± 5.6 ^b	5.3 ± 4.3 ^{ab}	2.0 ± 1.6 ^a
54	1	2.5 ± 1.7	2.2 ± 3.0	1.0 ± 0.9	2.8 ± 2.8	1.7 ± 2.1	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.0	1.5 ± 1.2	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.8
	2	2.9 ± 1.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	2.0 ± 2.4	1.5 ± 1.0	0.3 ± 0.8	1.3 ± 2.8	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0
	3	17.3 ± 9.2	2.5 ± 1.8	5.1 ± 5.1	12.5 ± 3.1	4.2 ± 3.3	1.0 ± 1.7	3.7 ± 2.4	7.8 ± 4.6	2.5 ± 1.9	0.7 ± 1.1
	4	29 ± 9.7	42 ± 17.5	18.1 ± 12.2	2.5 ± 1.6	8.5 ± 10.3	13.0 ± 6.3	6.3 ± 5.0	2.3 ± 1.4	2.3 ± 2.6	0.9 ± 1.2
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. tubercles/plant**		51.6 ± 11.0 ^d	46.8 ± 16.4 ^d	24.5 ± 11.3 ^c	19.8 ± 5.1 ^{bc}	15.8 ± 13.8 ^b	14.5 ± 6.9 ^{bc}	12.2 ± 5.9 ^b	12.0 ± 5.6 ^b	5.7 ± 4.4 ^{ab}	2.0 ± 1.6 ^a
61	1	2.4 ± 1.7	1.5 ± 2.0	1.0 ± 0.9	2.8 ± 2.8	1.7 ± 2.1	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.0	1.5 ± 1.2	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.8
	2	2.9 ± 1.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	2.0 ± 2.4	1.5 ± 1.0	0.3 ± 0.8	1.3 ± 2.8	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0
	3	13.3 ± 8.6	3.7 ± 1.9	4.6 ± 5.0	12.5 ± 3.1	3.3 ± 3.3	0.7 ± 1.6	3.7 ± 2.5	5.2 ± 3.4	3.2 ± 1.8	1.0 ± 1.8
	4	33.3 ± 10.4	42.2 ± 17.5	18.6 ± 12.3	2.5 ± 1.6	9.3 ± 11.7	13.3 ± 7	6.7 ± 5.1	5.0 ± 2.7	3.3 ± 3.2	1.3 ± 2
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nbre. tubercules/plant**		51.8 ± 11.0 ^c	47.5 ± 16.7 ^c	24.5 ± 11.3 ^b	19.8 ± 5.1 ^b	15.8 ± 13.8 ^b	14.5 ± 6.9 ^b	12.5 ± 5.9 ^b	12.2 ± 5.5 ^b	7.0 ± 4.0 ^a	2.7 ± 2.1 ^a
68	1	2.4 ± 1.7	1.5 ± 2.0	1.0 ± 0.9	2.8 ± 2.8	1.7 ± 2.1	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.0	1.5 ± 1.2	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.8
	2	2.9 ± 1.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	2.0 ± 2.4	1.5 ± 1.0	0.3 ± 0.8	1.3 ± 2.8	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0
	3	11.6 ± 6.1	3.5 ± 2.1	3.5 ± 4.8	8.3 ± 3.0	3.5 ± 3.6	0.7 ± 1.6	3.7 ± 2.7	4.3 ± 2.4	3.2 ± 1.8	1.1 ± 1.3
	4	35.4 ± 10.8	42.3 ± 17.5	18.1 ± 11.5	7.7 ± 1.9	9.3 ± 11.7	11.7 ± 6.5	6.7 ± 5.5	6.0 ± 3.8	3.3 ± 3.2	1.1 ± 1.2
	5	0	0	1.6 ± 3.1	0	0	1.7 ± 1.4	0.3 ± 0.5	0	0	0.4 ± 0.8
Nbre. tubercules/plant**		52.3 ± 11.1 ^d	47.5 ± 16.7 ^d	24.5 ± 11.3 ^c	20.8 ± 5.1 ^{bc}	16 ± 13.9 ^b	14.5 ± 6.9 ^{bc}	12.8 ± 5.6 ^b	12.2 ± 5.5 ^b	7.0 ± 4.0 ^{ab}	3.1 ± 2.1 ^a
75	1	2.4 ± 1.7	1.5 ± 2.0	1.0 ± 0.9	2.8 ± 2.8	1.7 ± 2.1	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.0	1.5 ± 1.2	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.8
	2	2.9 ± 1.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	2.0 ± 2.4	1.5 ± 1.0	0.3 ± 0.8	1.3 ± 2.8	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0
	3	11.4 ± 6.5	2.3 ± 2.7	3.5 ± 4.8	7.2 ± 3.1	2.8 ± 3.7	0.7 ± 1.6	3.2 ± 3.1	3.5 ± 2.3	3.3 ± 1.6	1.0 ± 1.4
	4	35.6 ± 11.2	42.0 ± 14.7	15 ± 9.4	8.8 ± 1.2	9.7 ± 12	9.5 ± 5.9	7.2 ± 5.4	6.8 ± 5.0	3.3 ± 3.2	1.1 ± 0.9
	5	0	1.5 ± 1.6	4.8 ± 4.8	0	0.3 ± 0.5	3.8 ± 3.1	0.5 ± 0.8	0	0	0.6 ± 1.1
Nbre. tubercules/plant**		52.3 ± 11.1 ^d	47.5 ± 16.7 ^d	24.5 ± 11.3 ^c	20.8 ± 5.1 ^{bc}	16.0 ± 13.9 ^b	14.5 ± 6.9 ^{bc}	13.0 ± 5.5 ^b	12.2 ± 5.5 ^b	7.2 ± 3.7 ^{ab}	3.1 ± 2.1 ^a
Transition 2-3 en jours		26	26	26	26	26	26	26	26	n.d	n.d
Transition 3-4 en jours		47	47	33	75	40	40	40	68	n.d	n.d
T ₅₀ en jours		13.4 ± 0.2	16.0 ± 0.5	15.1 ± 0.4	17.1 ± 0.4	17.9 ± 0.4	21.3 ± 0.6	16.6 ± 0.8	13.1 ± 0.4	n.d	n.d

* Stades de développement identifiés en accord avec l'échelle de notation de Labrousse *et al.* (2001), 1= orobanche germée et fixation sur les racines de l'hôte ; 2 = formation du tubercule ; 3 = tubercule possédant de nombreuses racines adventives ; 4 = tubercule possédant un bourgeon en croissance ; 5 = tubercule avec hampe florale.

** Données avec la même lettre (par ligne) ne sont pas significativement différentes (Test de Tukey, $P < 0.05$).

T₅₀, Temps médian depuis l'inoculation jusqu'à obtenir 50 % du nombre maximum de fixations. n.d., non déterminé.

(Tableau VI et Annexes I page 191). Le tableau VI reprend de façon synthétique les résultats obtenus dans l'annexe I. Sur le panel des 10 génotypes testés, il existe une variabilité importante du comportement des colzas vis-à-vis de *P. ramosa*. Tout d'abord, au niveau du nombre total de fixations par plante, Grizzly et Cooper sont les génotypes qui supportent le plus grand nombre de tubercules dès 12 jours ($19,3 \pm 8,4$ et $12,8 \pm 8,0$) et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation à 75 jours ($52,3 \pm 11,1$ et $47,5 \pm 16,7$). A l'inverse, à 12 jours, Campo supporte $0,5 \pm 0,5$ tubercules et Darmor aucun. A la fin de l'expérimentation à 75 jours, Campo est infesté par $7,2 \pm 3,7$ tubercules et Darmor par $3,1 \pm 2,1$ tubercules seulement, 7 à 15 fois moins que les génotypes les plus infestés. Compte tenu de ces divergences, le nombre de jours requis pour obtenir la demi-infestation a été calculé (T_{50}) et est similaire, aux alentours de 16 jai pour tous génotypes testés. Ceci indique que la cinétique globale de production des tubercules est sensiblement identique entre les génotypes. Cependant, la cinétique de développement des tubercules varie selon le génotype. A l'exception de Darmor et de Campo pour qui le nombre de fixations était trop faible, les dates de transition développementale des différents génotypes de colza ont été déterminées. Ces dates de transition correspondent au moment où le nombre d'orobanches atteignant un stade n+1 devient plus important que le nombre d'orobanches encore au stade n. Les transitions entre les stades 2 et 3 et les stades 3 et 4 ont ainsi été évaluées à partir des données hebdomadaires. Pour tous les génotypes, la transition 2-3 s'effectue à 26 jours, montrant ainsi que le développement précoce des orobanches s'effectue de manière similaire au début du développement de l'interaction sans qu'il y ait de mécanismes de résistance mis en place. En revanche, le développement tardif de l'orobanche (apparition du nombre de stades 4) varie de façon importante et dépend du génotype de colza (Figure 28 page 108). En effet, la date de transition 3-4 varie de 33 jours pour les orobanches fixées sur un génotype favorisant un développement précoce comme Expert jusqu'à 75 jours sur un génotype empêchant le

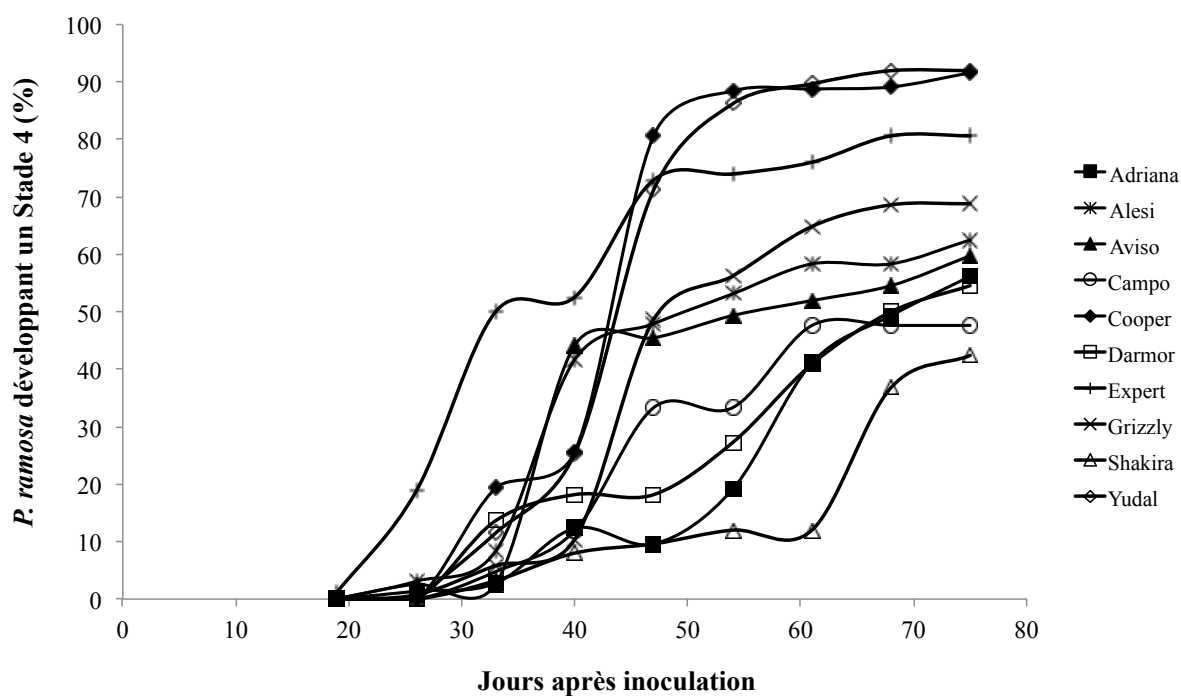


Figure 28 : Cinétique du développement des tubercules de *P. ramosa* en stade 4 pour les 10 géotypes de colza testés.

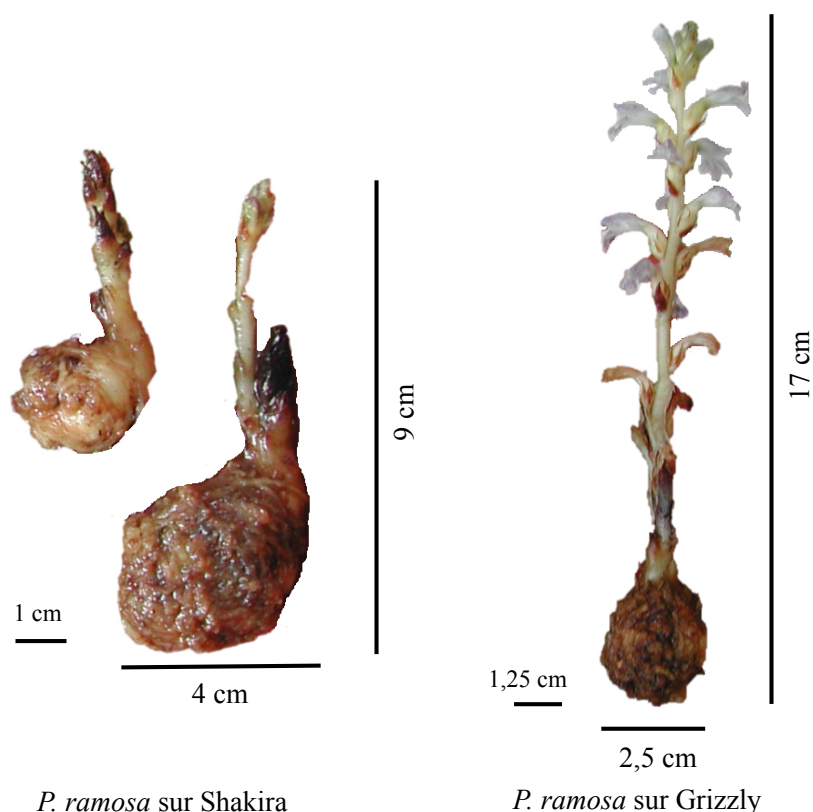


Figure 29 : Différences morphologiques entre les tubercules de *P. ramosa* fixés sur le géotype Grizzly et Shakira. Le développement des orobanches sur le géotype Shakira est perturbé : gros tubercule, tige petite et grêle. Sur le géotype Grizzly, développement normal d'une orobanche.

développement comme Shakira. Il faut noter qu'il n'y pas de corrélation entre le retard de développement de l'orobanche et le nombre de fixations d'orobanche sur le système racinaire de colza. Par exemple, les génotypes Yudal et Adriana portent tous deux un faible nombre de tubercules ($14,5 \pm 6,9$ vs $12,2 \pm 5,5$), mais diffèrent au niveau de la date de transition 3-4 : 40 jours pour Yudal et 68 jours pour Adriana. De tous les génotypes de colza testés, Expert est celui qui favorise le plus le développement de l'orobanche puisque la transition 3-4 se fait dès 33 jours après le semis. Viennent ensuite Alesi, Aviso et Yudal qui pour un même taux d'infestation (environ 15 tubercules/plant) provoquent la transition 3-4 à 40 jours. Grizzly et Cooper sont deux génotypes qui, bien qu'ils facilitent la fixation des orobanches dès 12 jours ($19,3 \pm 8,4$ et $12,8 \pm 8,0$ respectivement), induisent une transition de stades 3-4 un peu plus tard à 47 jours. Le génotype Adriana semble induire un retard de développement de l'orobanche puisque la transition 3-4 ne s'effectue qu'à 68 jours, comme chez Shakira qui bloque temporairement le développement des tubercules en stade 3. Le génotype Shakira provoque un fort ralentissement du développement du parasite, puisque cette transition 3-4 ne s'effectue qu'à la toute fin de l'expérience à 75 jours. Les orobanches ne présentent alors pas de hampe florale mais possède un tubercule beaucoup plus gros que ceux présents sur les autres génotypes (Figure 29).

2.4. Expérimentations en serres

Cinq génotypes présentant des réponses contrastées en expérimentations hydroponiques (Darmor, Campo, Shakira, Grizzly et Yudal) ont été étudiés en pot en serre afin de comparer leur réponse dans des conditions de culture différentes. Le nombre moyen de tubercules de *P. ramosa* par gramme de matière sèche de racine ne varie pas de manière significative 105 jours après le semis entre les génotypes Campo ($4,8 \pm 1,1$), Shakira ($5,1 \pm 1,7$) et Grizzly ($5,9 \pm 1,7$) et Yudal ($6,2 \pm 2,2$) alors que seul Darmor supporte moins de

fixations d'orobanche ($1,9 \pm 0,8$). Au niveau des dates d'émergence hors du substrat, les premières hampes florales émergent dès 89 jours de co-culture pour Yudal, 90 jours pour Darmor, 93 jours pour Campo et 96 jours pour Grizzly. Pour Shakira, les hampes florales émergent beaucoup plus tardivement, vers 102 jours après le semis et ces orobanches sont les seules à présenter un phénotype « gros tubercules » avec de petites et fines tiges (Figure 29 page 108).

3. Discussion-Conclusion

Alors que des sources de résistance à l'orobanche ont déjà été rapportées et étudiées chez de nombreuses espèces cultivées comme le tournesol et les légumineuses (Pérez-de-Luque *et al.*, 2009 ; Rubiales *et al.*, 2011), il existe peu de documentation sur le fond de résistance du colza contre *P. ramosa*. L'interaction *B. napus*-*P. ramosa* peut être considérée comme un problème économiquement récent comparée aux autres interactions plantes-plantes parasites et la sélection pour une résistance n'a pas été développée chez le colza comme chez d'autres espèces cultivées confrontées depuis plus longtemps à la problématique orobanche (légumineuses et tournesol). Les problèmes causés par *P. ramosa* dans les champs de colza français sont devenus une source d'inquiétude importante depuis le milieu des années 90. C'est pourquoi la filière professionnelle concernée a souhaité dans le cadre de ce travail de thèse initier une étude visant à identifier des sources de résistance vis-à-vis de l'orobanche rameuse chez des génotypes de colza d'intérêt. Bien qu'au cours de cette étude il n'y ait pas eu de résistances complètes mises en évidence, des comportements contrastés de certains génotypes de colza infestés par *P. ramosa* ont été observés en étudiant cette interaction en culture en hydroponie et en serre. Ces comportements peuvent être associés à des mécanismes d'évitement du parasite et/ou des mécanismes de résistance partielle, contrairement au tournesol chez qui des gènes de résistance (*Or1-5*) confèrent une résistance totale aux différentes races d'*O. cumana* (Vranceanu *et al.*, 1980).

Dans un premier temps, les expérimentations menées en co-cultures hydroponiques montrent que la sévérité de l'infestation est partiellement liée au taux de germination des graines d'orobanches induit par les racines de la plante hôte. Cette capacité à induire la germination des graines d'orobanche varie fortement, d'une faible induction (Darmor, $15,0 \pm 7 \%$) à une forte induction de la germination (Cooper, $83,0 \pm 4,0 \%$). Ces différences de taux de germination semblent traduire une variabilité significative de la production et/ou du panel des stimulants de la germination contenus dans les exsudats racinaires des colzas comme cela a déjà été décrit dans d'autres interactions avec l'orobanche, incluant le tournesol (Labrousse *et al.*, 2001), les légumineuses (Rubiales *et al.*, 2003c ; Sillero *et al.*, 2005) et le sorgho confronté quant à lui à *Striga hermontica* (Hausman *et al.*, 2001). L'étude et la compréhension de ce mécanisme d'évitement du parasite dû à une faible capacité de certaines plantes hôtes à induire la germination de l'orobanche est donc un point clé de la résistance des plantes aux plantes parasites. C'est notamment le cas ici des génotypes Darmor, Campo et Shakira en conditions hydroponiques. Cependant chez ces génotypes, cette résistance est partiellement supprimée sous forte infestation artificielle, c'est à dire lorsque les colzas sont infestés par des graines prégermées par du GR24. Dans ces conditions, il est observé une augmentation très importante du nombre d'orobanches fixées par plante surtout pour le génotype Shakira qui voit le nombre de fixations doubler voire tripler sur son appareil racinaire. De manière similaire, l'évitement du parasite est artificiellement supprimé dans les interactions *O. crenata*- et *O. minor*-*A. thaliana* quand les graines sont également stimulées par du GR24. *A. thaliana* est décrite comme étant peu stimulatrice de la germination de ces deux espèces mais malgré tout extrêmement sensible à l'orobanche. Ainsi la prégermination de ces graines provoque une pression parasitaire forte permettant à ces graines stimulées de se fixer facilement (Westwood *et al.*, 2000). De manière intéressante, dans nos expérimentations, l'établissement des tubercules d'orobanche sur Darmor ($5,6 \pm 2,2$) et Campo ($6,1 \pm 2,5$) reste

cependant limité sous forte pression parasitaire quand le nombre d'orobanches fixées est comparé à celui sur Shakira ($12,0 \pm 3,2$). Cette limitation de l'établissement des orobanches sous forte pression parasitaire peut être considérée comme une seconde composante de la résistance. Cet empêchement à la fixation pourrait être associé à des renforcements pariétaux dans les tissus des racines de l'hôte. En effet, chez des génotypes résistants de pois chiche, de pois ou de tournesol, le nombre d'orobanches fixées peut être faible suite à la mise en place de ce type de mécanismes (Rubiales *et al.*, 2003c ; Pérez de Luque *et al.*, 2003a et b ; Labrousse *et al.*, 2001). Cependant des expériences supplémentaires doivent être réalisées pour analyser et comprendre de manière précise cette composante de la résistance mis en évidence dans l'interaction colza-*P. ramosa*. Le dernier composant de la résistance du colza vis-à-vis de l'orobanche rameuse intervient plus tard au cours de l'interaction. En effet, alors que le développement des tubercules n'est pas entravé quand ils se sont bien établis sur les racines des génotypes les plus sensibles comme Grizzly et Cooper, chez qui des développements précoces de hampes florales sont observés (47 jai), les tubercules fixés sur le génotype Shakira présentent un retard de débourrement, puisque cette transition ne s'effectue qu'après 75 jours. Cette perturbation induite par le génotype Shakira se traduit par une morphologie atypique des orobanches. Les orobanches présentent un gros tubercule et une hampe florale grêle quand les orobanches en présentent une (Figure 29 page 108). Ce type de résistance a aussi été caractérisé chez certaines accessions résistantes de légumineuses où le développement de tubercules d'*O. crenata* est stoppé ou retardé pendant les jeunes stades de développement (Sillero *et al.*, 2005b ; Fernandez-Aparicio *et al.*, 2009). Dans le cas de l'étude ici présentée, la croissance du tubercule des orobanches sur le génotype Shakira suggère une dérégulation des niveaux hormonaux et une altération de la force de puits du parasite (Péron, 2010). Enfin et de manière générale, sur tous les génotypes testés, des nécroses de tubercules d'orobanche ont été observées mais ceci ne semble pas être dû à des mécanismes de

résistance. Ces nécroses paraissent plutôt être liées à une compétition trophique entre les tubercules établis. En effet, les nécroses sont rares et apparaissent précocement (26 jai), et aucune différence significative en terme de fréquence et de date d'apparition n'est observée parmi les dix génotypes testés. L'ensemble de ces résultats confirme le bon comportement de Darmor alors que Yudal considéré préalablement comme un génotype très sensible, s'avère ne pas être le génotype le plus sensible. Ainsi, bien qu'aucun génotype présentant une résistance plus forte que Darmor n'ait été identifié, les expérimentations menées en co-cultures hydroponiques ont été une bonne stratégie pour étudier finement l'interaction colza-*P. ramosa* au cours du temps et pour évaluer de potentielles sources de résistance afin d'identifier des composantes de la résistance associés. Les résultats obtenus lors de ces expérimentations tendent à montrer que la résistance du colza vis-à-vis de *P. ramosa* est multifactorielle et exprimée à différents stades de l'interaction, depuis l'induction de la germination des graines du parasite, la production et la croissance des tubercules, jusqu'au développement tardif post-fixation du parasite. Cependant, lors des expérimentations en pot en serre, les 5 génotypes de référence ont montré des comportements différents de ceux obtenus en conditions hydroponiques. Alors que le nombre total de tubercules supportés par Campo, Yudal, Shakira et Grizzly diffère dans les expérimentations en hydroponie, ces différences ne sont plus observées en co-cultures en pot où les nombres totaux de tubercules récupérés ne sont pas significativement différents (environ 5 tubercules/g MS de racine). Ceci suggère que la première composante de la résistance basé sur une faible induction de la germination a été supprimé en pots. La germination des graines d'orobanche dans le sol dépend de la quantité et de la qualité des stimulants de germination dans la rhizosphère. Les strigolactones sont connus pour être les stimulants de la germination majoritairement produits par les plantes (Yoneyama *et al.*, 2010) mais une étude récente suggère que le colza comme d'autres membres de la famille des *Brassicaceae* (notamment *A. thaliana*) (Goldwasser *et al.*,

2008) ne produirait des strigolactones qu'en très infimes quantités (Auger *et al.*, 2012). D'autres études ont d'autre part démontré que les isothiocyanates (ITC), des produits de dégradation des glucosinolates sécrétés dans le sol déclenchent eux aussi la germination de *P. ramosa* lors de tests *in vitro* (Virtue *et al.*, 2006), et sont les composés majoritaires dans la rhizosphère du colza en pot et en plein champ (Auger *et al.*, 2011). Ainsi donc, en fonction des conditions de co-culture, la capacité des colzas à induire la germination des graines d'orobanche dépendrait fortement de la production d'ITC. Cependant, dans la rhizosphère du colza, les ITC sont formés par l'hydrolyse des glucosinolates par des enzymes, les myrosinases produites et relâchées par les microorganismes et/ou par les plantes en réponses à des blessures. En conséquence, la production d'ITC serait possible en co-cultures en pot ou en plein champ, mais semblerait compromise en condition hydroponique où la production de glucosinolates doit être limitée par l'absence de blessures des racines ou un manque de microorganismes. La germination des graines d'orobanche dans le système hydroponique pourrait reposer essentiellement sur la production génotype-dépendante des strigolactones, alors qu'en pots ce serait les ITC produits en grande quantité, qui contourneraient ainsi le premier mécanisme de résistance associé à la production de strigolactones. En parallèle de cette étude, une expérience en pot a été réalisée en utilisant un substrat préalablement stérilisé par autoclavage. Ces plants de colza en pots ont été cultivés dans les mêmes chambres de culture que les expériences en hydroponie. Il s'avère que dans ces conditions les colzas ne présentaient aucune fixation (Comm. Pers. M. Voisin). Ceci conforte l'idée que les ITC agissent comme des stimulants majoritaires du colza grâce à l'action de la microflore du sol. Ce fait a une conséquence majeure sur les travaux de sélection de génotypes de colza résistants à l'orobanche. En effet, les récents travaux sur les stratégies envisagées dans la lutte contre l'orobanche sont essentiellement basés sur la sélection de génotypes faiblement inducteurs comme cela a été proposé chez le riz ou le pois (Umehara *et al.*, 2008 ; Gomez-

Roldan *et al.*, 2008), mais cette stratégie semble difficilement applicable à l'heure actuelle chez le colza puisque la stimulation de la germination semble multifactorielle et que la génomique de la synthèse des glucosinolates est plus complexe que celle des strigolactones.

Néanmoins, les expériences en pots confirment l'implication des deux autres composantes de la résistance. D'une part, l'infestation du génotype Darmor reste significativement réduite comparée aux autres génotypes testés suggérant que Darmor est partiellement résistant à la fixation des orobanches. Ceci est en accord avec les résultats obtenus en hydroponie. D'autre part, les émergences des hampes florales d'orobanche sur le génotype Shakira ont lieu une vingtaine de jours après les autres génotypes indiquant un retard induit dans le développement de l'orobanche également en accord avec les expériences en hydroponie. Le phénotype particulier des orobanches sur Shakira est observé dans les deux conditions expérimentales, suggérant que le génotype Shakira induit des désordres de développement chez l'orobanche dont les mécanismes associés restent à être étudiés.

Ce travail financé par le CETIOM et l'ONIDOL a été réalisé dans le cadre d'un programme Promosol. Il avait pour but d'identifier et de caractériser des mécanismes de résistance du colza vis-à-vis de *P. ramosa*, plantes parasite des grandes cultures causant des problèmes croissants dans les champs de colza en France. Dans un premier temps, cette étude a montré que le système de co-cultures hydroponiques permettait une étude précise de l'interaction *Brassica napus-Phelipanche ramosa* : pourcentage d'induction de la germination, fixation des graines germées sur les racines de l'hôte, et croissance des tubercules. A l'aide des génotypes de colzas testés, il a été mis en évidence deux composantes de la résistance post-fixation : la première consiste en la limitation de la fixation des orobanches sur les racines du génotype Darmor, la seconde en un empêchement du développement de l'orobanche sur les racines du génotype Shakira. La combinaison de ces mécanismes de

résistance liés dans un idéotype et l'évaluation de la résistance de la descendance Shakira x Darmor (obtenue par l'INRA de Rennes), où les caractères faible inducteur de la germination, faible fixateur et retardateur du développement de l'orobanche pourraient être cumulés, feront l'objet d'un futur projet. Puisque aucune résistance totale n'a pu être identifiée, un crible plus large des ressources génétiques du colza, mais aussi des parents *Brassica oleracea* et *Brassica rapa* ainsi que des espèces relativement proches ou sauvages (*Brassica carinata*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*...) doit être envisagé pour renforcer la résistance et pour faciliter leur caractérisation. La comparaison des comportements au champ et des résultats obtenus au laboratoire des génotypes testés suggère de bonnes performances de certaines accessions comme Shakira qui pourraient être liées aux composantes de la résistance caractérisés dans notre étude. Dans le cas des génotypes Grizzly et Cooper, ceux-ci se révèlent très sensibles en conditions contrôlées mais présentent un comportement divergeant au champ. Grizzly est tolérant au champ tandis que Cooper semble peu tolérant, ce qui suggère la présence de traits de tolérance qu'il faudrait également prendre en compte lors des prochains programmes de sélection.

*Chapitre 3 : Induction de mécanismes de
résistance chez le colza par des stimulateurs
des défenses naturelles (SDN) : le BTH et la
laminarine*

CHAPITRE 3 - Induction de mécanismes de résistance chez le colza par des stimulateurs des défenses naturelles (SDN) : le BTH et la laminarine

1. Stimulation des défenses du colza par le BTH

Une méthode de lutte proposée contre l'attaque d'agents pathogènes est l'utilisation de stimulateurs des défenses naturelles (SDN). L'un d'entre eux est l'ASM, (acibenzolar-S-méthyl), commercialisé sous le nom de Bion[®] (Syngenta) ou BTH (benzothiadiazole, benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid (S) methylester). Cet éliciteur est un analogue structural de l'acide salicylique (SA) et un activateur de défenses systémiques. Il est efficace sur une large gamme de plantes annuelles telles que le blé, le riz, et la tomate (Pasquer *et al.* 2005, Shimono *et al.* 2007, Herman *et al.* 2008), et ce contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus. Ainsi un prétraitement au BTH de jeunes feuilles de colza par du BTH est efficace contre l'infestation par *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*. Cette résistance s'accompagne d'une accumulation dans les feuilles des transcrits codant pour des protéines PR : PR-1 et PR-2, et conduit à la mise en place d'une SAR (Résistance systémique acquise) (Potlakayala *et al.* 2007). L'efficacité de l'ASM a aussi été mise en évidence dans des interactions avec l'orobanche. En effet, l'immersion de graines de tournesol dans une solution de BTH entraîne une réduction du nombre de fixations d'*O. cumana* (Sauerborn *et al.* 2002). Ceci est accompagné de l'accumulation d'une chitinase, de phytoalexines et d'H₂O₂ au niveau des racines, mais n'est pas associé à une lignification des racines. De même, une diminution du nombre de fixations d'*Orobanche minor* est obtenue sur les racines de *Trifolium pratense* (trèfle) si celles-ci ont été prétraitées à l'ASM (Kusumoto *et al.* 2007). Dans ce cas, des observations de coupes histologiques montre que cette diminution est liée à la lignification de l'endoderme. Chez le pois, un traitement foliaire induit une diminution du nombre de fixations d'*O. crenata* de près de 50 % (Pérez de Luque *et al.*,

2004). De même, des traitements foliaires et racinaires au BTH de plants de colza cultivés en pots permettent de réduire de 70% le nombre de fixations de *Phelipanche ramosa* et de diminuer les pertes de rendement (Véronési *et al.* 2009).

Compte tenu de ce dernier résultat, l'objectif de ce travail a donc été de déterminer plus précisément l'action du BTH sur le colza et de tenter d'identifier, par une approche de transcriptomique (cDNA-AFLP) les réactions et/ou voies de défense déclenchées au niveau des racines après applications foliaires du SDN et qui seraient susceptibles d'intervenir dans la résistance à l'orobanche.

1.1. Matériel et méthodes

1.1.1. Matériel végétal

1.1.1.1. Stérilisation des graines et mise en place du système de culture

Les graines de colza du génotype Yudal, témoin de sensibilité déjà utilisé dans des études précédentes (Véronési *et al.*, 2009) sont stérilisées par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel 12%) pendant 5 minutes et rincées 3 fois 5 minutes puis 3 fois une minute à l'eau distillée stérile.

Une douzaine de graines sont déposées entre 2 feuilles de papier de verre dans des boîtes de Pétri de Ø 19 cm scellées avec du parafilm. Les boîtes sont placées pendant 7 jours à 23 °C, 300 mmol m⁻² s⁻¹ radiations actives photosynthétiques avec une photopériode de 16h/8h lumière/obscurité. Une plantule est transférée dans des boîtes de Petri rondes Ø 19 cm sur une feuille de papier de verre superposée à une couche de laine de roche. La nutrition des plants de colza est effectuée par la solution minérale Coïc à 50% et les plants sont cultivés pendant 4 semaines.

1.1.1.2. Traitement des feuilles de *B. napus* par une solution de BTH

Des plantules de colza âgées de 4 semaines ont été traitées par une solution de BTH. 18 plants de colza sont traités par pulvérisation par une solution de BTH (0,05 g.L⁻¹ a.i. ASM ; 0,01 % Tween 20) jusqu'à ruissellement et 18 autres par du Tween 0,01 % (traitement contrôle). Les prélèvements des racines en vue des extractions d'ARN sont effectués à différents temps. L'expression des gènes est suivie par PCR semi quantitative.

1.1.1.3. Traitement des racines de *B. napus* par une solution de BTH

Les racines des plants de colza ont été mises directement au contact d'une solution de BTH dont la concentration a été doublée à 0,1 g.L⁻¹ a.i. Le traitement est réalisé sans adjonction de Tween, le BTH étant formulé pour les applications sur les plantes. Les plants de colza sont baignés dans une solution de BTH à 0,1 g.L⁻¹ a.i pendant 2 heures (ou d'eau milliQ), le système racinaire est ensuite rincé à l'eau distillée afin d'éliminer au maximum la solution de BTH. Puis les colzas sont remis en contact avec la solution nutritive COÏC 50%. Les prélèvements de racines sont réalisés à T_{0h} : les racines n'ont pas subi de traitement, Puis prélevés à T_{1h} ; T_{12h} ; T_{24h} et T_{48h} après le traitement.

1.1.1.4. Traitement des feuilles d'*A. thaliana* par une solution de BTH

L'objectif de ce traitement sur *A. thaliana* a eu pour but de confirmer les résultats obtenus sur colza. Pour cela deux répliques d'une cinquantaine de plantules de l'écotype *Columbia* ont été traitées par pulvérisation foliaire par une solution de BTH à 0,1 g.L⁻¹ a.i. jusqu'à ruissellement. Les traitements ont été opérés sur des plantules âgées de 4 semaines à T_{0h} (témoin) puis T_{24h} et T_{48h}.

1.1.1.5. Effet d'un traitement BTH sur l'interaction *B. napus* - *P. ramosa*

Huit plantules du génotype Yudal âgées de 7 jours ont été traitées au niveau des racines pendant 2 h par une solution de BTH 0,1 g.L⁻¹ a.i. puis rincées 2 fois à l'eau distillée stérile. Les plantules sont transférées dans le montage en hydroponie décrit plus haut, le système racinaire étant infesté par 750 graines pré-germées pendant 3 jours au GR24 (3,35 nM). Le dénombrement des orobanches fixées est réalisé 4 semaines après l'application du traitement. Les résultats sont issus de 2 répétitions et sont exprimés comme étant la moyenne de 16 répétitions biologiques et analysés statistiquement par un test de Student-Newman-Keuls $P < 0,001$.

1.1.2. Analyses transcriptomiques

1.1.2.1. Extraction des ARN totaux pour les analyses cDNA-AFLP et PCR semi-quantitatives

Les ARN de colza ont été extraits à partir de 100 mg de racines préalablement broyées dans l'azote liquide. L'extraction est effectuée en présence d'1ml de Trizol (Invitrogen) qui détruit les cellules et dissout les composés cellulaires tout en maintenant l'intégrité des ARN. Après centrifugation 10 000 rpm, 10 min à 4°C, le surnageant est récupéré auquel est ajouté 0,2 ml de chloroforme. Après centrifugation 10 000 rpm, 15 min à 4°C et récupération de la phase aqueuse supérieure, les ARN sont précipités avec 0,5 ml d'isopropanol pendant 12h à -20°C. Après centrifugation 10 000 rpm, 10 min à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 75% puis centrifugé 8 000 rpm, 5 min à 4°C. L'éthanol est éliminé en totalité avant de reprendre le culot dans 50 µL d'eau milliQ. Après vérification de la qualité des ARN sur gel et dosage spectrophotométrique au NanoDrop[®], les ARN subissent un traitement à la DNaseI.

1.1.2.2. Extraction des ARN totaux pour les analyses q-RT-PCR

Le matériel végétal conservé à -80°C est broyé dans de l'azote liquide. L'extraction des ARN totaux est réalisée en utilisant le kit « RNeasy Plant Mini Kit », selon les instructions du fournisseur (Qiagen). Une étape de dégradation de l'ADN génomique a été réalisée en utilisant l'enzyme DNase I (0,02 U μl^{-1} , New England Biolabs) conformément au protocole fourni. La quantité d'ARN extrait est mesurée par dosage spectrophométrique au Nanodrop (Thermoscientific). Pour la synthèse des ADNc simples brins par reverse transcription (RT-PCR), le kit "SuperScript II Reverse Transcriptase" (Invitrogen, Life Technologies) a été utilisé. 500 ng d'ARN traités à la DNase sont repris dans un volume final de 11 μl auxquels sont ajoutés 1 μl d'oligo dT (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et 1 μl de dNTP (10 mM). Le mélange est incubé 5 min à 65°C puis placé rapidement sur glace. Quatre μl de tampon 5X First Strand et 2 μl de DTT (0,1 M) sont alors ajoutés au mélange et incubés 2 min à 42°C. Puis 1 μl de reverse transcriptase SuperScript II (Invitrogen) est ajouté. Après homogénéisation et centrifugation le mélange est incubé 50 min à 42°C. La réaction est inactivée en chauffant 15 min à 70°C. Les échantillons ADNc peuvent être conservés à -20°C.

1.1.2.3. Traitement à la DNase des ARN

Cinq μg d'ARN sont resuspendus dans un mélange final de 50 μl de tampon de réaction 1X DNaseI (New England Biolabs, Ipswich, MA) auquel est ajouté 1 unité d'enzyme DNase I. Le mélange est incubé pendant 10 minutes à 37 °C. L'ajout d'1 μl d'EDTA (0,5 M) permet ensuite d'inactiver l'enzyme pendant 10 min à 75°C. Les ARN traités sont alors dosés au NanoDrop® et leur intégrité visualisée sur gel d'agarose 1%, TBE 1X.

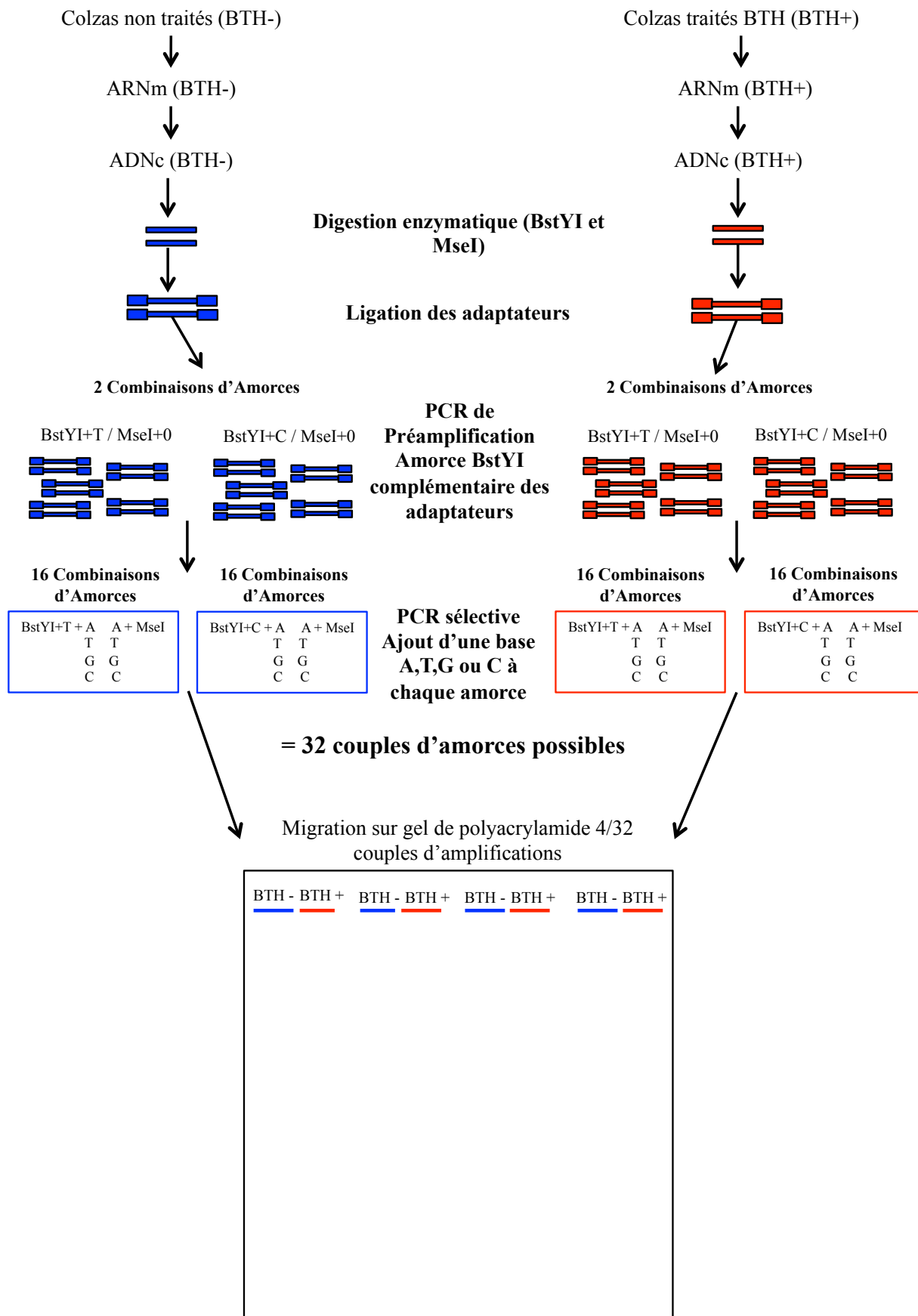


Figure 30 : Schéma récapitulatif des étapes de la technique cDNA-AFLP

1.1.2.4. cDNA AFLP

La procédure cDNA AFLP réalisée dans cette étude est adaptée du protocole de Vuylsteke *et al.*, (2007). En résumé, il s'agit de digérer des ADNc obtenus après reverse-transcription des ARN messagers puis de réaliser successivement une pré-amplification PCR sélective suivie d'une amplification sélective. Les produits d'amplification marqués au Phosphore 33 sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide permettant alors d'identifier les fragments de digestion différenciellement exprimés entre différentes conditions (Figure 30). Nous avons ainsi comparé de manière globale le transcriptome de racines de colza traitées ou non par une application foliaire de BTH.

- **Préparation de la matrice ADNc pour le cDNA AFLP**

A partir des ARN totaux extraits, la synthèse des ADNc premier brin est effectuée. Deux µg d'ARN totaux sont repris dans 24 µl d'eau MilliQ auxquels sont ajoutés 16 µl d'un mélange réactionnel contenant 1µl d'oligo dT25 bio (100 µM), 8 µl de « First Strand Buffer 5X », 4 µl de DTT (0,1 M), 2 µl de dNTPs (10 mM) et 1 µl d'enzyme superscript II (Invitrogen) (200 U/µl). La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée par incubation 2h à 42 °C. La synthèse du second brin d'ADNc est ensuite réalisée par ajout de 120 µl d'un mélange réactionnel comprenant 16 µl de « Second Strand buffer 10 X (*E.coli* ligase buffer NEB), 3 µl de dNTPs (10mM), 6 µl de DTT (0,1 M), 1,5 µl de *E.coli* ligase (10 U/µl), 5 µl de *E.coli* polymerase I (DNA polymerase I NEB) (10 U/µl), 0,35 µl de RNase H (Ribonucléase H NEB) (5 U/µl), et 3,6 µl de NAD (10 mM). L'ensemble du mélange réactionnel (160 µl) est incubé 1h à 12 °C puis 1h à 22 °C successivement. Les ADNc double brin sont ensuite purifiés à l'aide du kit de purification « Nucleospin[®] Extract II kit » de Macherey-Nagel (Düren, Germany), puis dosés au Nanodrop.

La matrice ADNc double brin ainsi obtenue est ensuite digérée successivement par deux enzymes de restriction, BstYI puis MseI, générant alors de nombreux fragments de digestion. La première digestion enzymatique est réalisée par l'enzyme BstYI reconnaissant le motif R/GATCY. Trente µl de mélange de digestion BstYI (200 ng d'ADNc, 10 U BstYI, tampon RL 1X [10 mM Tris-HAc (pH 7,5); 10 mM MgAc; 50 mM KAc, 5 µM DTT] sont incubés 2h à 60°C, température optimal d'activité de BstYI. La seconde étape de digestion des ADNc est réalisée par l'enzyme de restriction MseI qui reconnaît le motif T/TAA. Aux 30 µl de réaction BstYI sont ajoutés 10 µl de mélange de digestion MseI (10 U MseI, 1 µl de tampon RL, 0,4 µl de BSA 100X, H₂O qsp 10 µl). Le mélange est alors incubé 2h à 37°C.

Aux produits de digestion des ADNc obtenus sont ensuite ajoutés des « adaptateurs » nucléotidiques permettant aux amorces utilisées dans les amplifications PCR suivantes de se fixer. Les adaptateurs BstYI-F (BstYI-F: 5' – CTCGTAGACTGCGTAGT – 3') et BstYI-R (BstYI-R: 5' -GATCACTACGCAGTCTAC – 3') sont préparés à une concentration de 5 µmol/µl. les adaptateurs MseI sont quant à eux préparés à une concentration finale de 50 µmol/µl (MseI-F : 5' – GACGATGAGTCCTGAG – 3' et MseI-R : 5' – TACTCAGGACTCAT – 3'). La préparation des adaptateurs se termine par 3 incubations successives 10 min à 65 °C, 10 min à 37 °C, 10 min à 25 °C. Aux 40 µl de digestion sont ajoutés 10 µl de mélange d'adaptateurs contenant 1 µl d'adaptateurs BstYI (5 µmol/µl), 1 µl d'adaptateurs MseI (50 µmol/µl), 1 µl d'ATP 10 mM, 1 µl de Tampon RL 10X, 1 U T4 DNA ligase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 10 U BstYI et H₂O qsp 10 µl. Le mélange réactionnel est incubé pendant 3h à 37 °C.

- **Pré-Amplification par PCR des produits de digestion**

Cette première PCR permet de sélectionner dans un premier temps les transcrits présentant à leurs extrémités les nucléotides A ou G. En effet, l'amorce BstYI

complémentaire de la séquence des adaptateurs BstYI est complétée en son extrémité 3' soit par une base T (BstYI+T : 5' – GACTGCGTAGTGATCT – 3') soit par une base C (BstYI+C : 5' – GACTGCGTAGTGATCC – 3'). L'amorce MseI quant à elle correspond à la séquence de l'adaptateur MseI (MseI+0 : 5' – GATGAGTCCTGAGTAA – 3'). Les échantillons sont d'abord dilués au demi dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA pH8 0,1 mM). Cinq µl de matrice sont ajoutés au mélange réactionnel constitué de 1,5 µl d'amorce BstYI+T (ou C) 10 µM, 1,5 µl d'amorce MseI+0 10 µM, 1 µl dNTPs à 10 mM, 1 U de Taq polymérase (NEB), 5 µl de tampon Taq (100mM Tris-HCl pH 8,3 ; 500 mM KCl), 2 µl de MgCl₂ 25mM, et H₂O qsp 45 µl. L'amplification PCR est composée de 26 cycles : 30 sec 94°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C.

- **Etape d'amplification sélective avec des amorces marquées au ³³P**

L'amplification sélective est opérée grâce à l'utilisation d'amorces présentant à leur extrémité 3' une base A, T, G ou C (N) : BstYI+T+N ou BstYI+C+N et MseI+N. Ceci permet de sous diviser les ADNc totaux en 32 populations facilitant ainsi la visualisation des fragments différenciellement exprimés entre les différents échantillons.

Le marquage des amorces BstYI+T+N et BstYI+C+N au ³³P est réalisé par incubation 45 min à 37 °C puis 10 min à 80 °C du mélange réactionnel suivant : 0,1 µl d'amorce BstYI-T ou C+N (10 µM), 0,1 µl ³³P-γ-ATP (≈2000 Ci/mmol), 0,05 µl Tampon T4 10X (250 mM Tris.HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5 mM spermidine), 0,2 U T4 polynucléotide kinase (NEB), H₂O qsp 0,5 µl. La T4 polynucléotide kinase permet le transfert du phosphate γ de l'ATP sur l'ADN. Chaque échantillon issu de la pré-amplification est dilué au 1/200 dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA pH8 0,1 mM). Cinq µl sont alors utilisés pour cette seconde amplification sélective. Le mélange réactionnel contient pour un volume final de 20 µl : 0,5 µl d'amorce BstYI+T/C+N* (* marqué au ³³P), 300 nM final d'amorce MseI+N, 200

μM de dNTPs, 2 μl de tampon Taq 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl), 1 mM de MgCl_2 et 0,5 U de Taq polymérase (NEB). L'amplification PCR est composée d'une étape de dénaturation initiale de 10 min 94°C , de 13 cycles : 10 sec à 94°C , 30 sec à 65°C avec une diminution de $0,7^\circ\text{C}/\text{cycle}$, 72°C 1 min, puis de 23 cycles : 94°C 10 sec, 56°C 30 sec en avec une augmentation de 1 sec/cycle et 2 min à 72°C . La réaction de PCR est ensuite stoppée par l'ajout de 20 μl d'une solution stop (95% formamide, 20 mM EDTA pH8,0, 0,05% (w/v) de bleu de bromophénol, 0,05% (w/v) xylène cyanol).

- **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Les produits PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur un grand gel de polyacrylamide à 8 % (10 mM d'urée ; 12,5 ml d'acrylamide/bisacrylamide 40 %) dans une cuve à électrophorèse verticale (Apparatus S2001, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) à 1500 V, 45 W, 40 mA pendant 2h. Le marquage est effectué par autoradiographie sur film (BioMax XAR film, Kodak, Rochester, N.Y., USA) pendant une nuit et révélé sur une développeuse Curix 60 (AGFA, Belgique).

- **Récupération des bandes d'intérêts**

Le gel d'acrylamide est récupéré sur une feuille de papier Whatman puis mis à sécher dans un sécheur de gel (model 583, Biorad, CA, USA) pendant 3h à 80°C . Le film autoradiographique révélé est juxtaposé sur le gel séché afin d'y marquer l'emplacement des bandes d'intérêts contenant l'ADNc du TDF (Transcribed derived fragment). Les bandes sont alors découpées du gel et éluées 2h à température ambiante dans 150 μl de tampon Tris-EDTA (10mM ; 0,1 mM). Les échantillons sont stockés à 20°C avant analyses.

Après élution des bandes d'intérêts, l'ADNc est amplifié par PCR. Le mix PCR se compose de 0,75 μl d'amorces BstYI+T/C (10 μM) et MseI (10 μM), 0,5 μl de dNTPs (10

Tableau VII : Liste des amorces utilisées pour les PCR semi-quantitatives et qRT-PCR

Voie Signalisation	Fonction	Nom amorces	N° accession	Source /origine	Séquences amorces
Contrôle	EF-1a	Bn-Ef1	DQ312264	Leblanc <i>et al.</i> , 2008	TTTCGAGGGTGACAACATGA
					CCGTTCCAATACCACCAATC
Synthèse JA	Lipoxygenase 1	BnLox1fl	AY162142	Terp <i>et al.</i> , 2006	TGGGAGGGTCACAGGAGTATC
	Lipoxygenase 2	BnLox2fl	AY162143	Terp <i>et al.</i> , 2006	CCTTGTTCGGGTGGTGTAT CGTCCCATTTGGGAGGCTCT AGGTGCTATCATCCAACCTCT
Reponse voie JA	Polygalacturonase inhibitory protein 2	BnPgip2	AF529694	Li <i>et al.</i> , 2003	GACAAAACCAACCTCCTCAA AACGACCCAAATGACTCTGG
Réponse voie SA	PR-1	BnPR-1	U21849/U70666	Borges <i>et al.</i> , 2003 / Potlakayala <i>et al.</i> , 2007 / Liu <i>et al.</i> , 2007	CCTGTGGGAGCTCTTGTTC TAATTGCCCGAGGATCATA
	PR1 (qPCR)	qBnPR1	U21849/U70666	Primer express	CTGGGTTTGTGGTGACGAT GTGTGCCTAGGACGACCAACA
	B-1,3 glucanase	Bn-PR-2	X77990/AI352737	Newman <i>et al.</i> , 1994 / Fristensky <i>et al.</i> , 1999	ACGCCAATCTCGACTCAGTT GTGCAACGGTTAAGGCTCAT
	B-1,3 glucanase (qPCR)	qBnPR2	X77990/AI352737	Primer express	CCAGTCCGTTACCAAACTTC CCCCGCCGATTCTC
ROS	Ascorbate peroxidase	Bn-BnAPX	Y11461	Borges <i>et al.</i> , 2003 / Liu <i>et al.</i> , 2007	GAAGTGTGACCAATCATGG GTGGCATCTCCAGAGTGT
Phenylpropanoïdes	Phenylalanine ammonia lyase 1	Bn-Pal 1-1	DQ341308	Ni <i>et al.</i> , 2008	AACAACTCAAATTCCTTAAACAACAAAA GGTAATGTGTGGGATGTTCC
	Phenylalanine ammonia lyase 2	Bn-Pal 1-2	DQ341309	Ni <i>et al.</i> , 2008	TGGAGATTAACGGATCATACAAAAG CTTCTGAAGTGCACGCCATTT
	Chalcone synthase	Bn-CHS (A1)	EF101136	Jiang <i>et al.</i> , 2008	ATGGTGATGTGACACCGTC TTAGAGAGGAACGCTGTGC
Synthèse éthylène	ACC synth	Bn-ACS	EV058378/AF338651	Primer 3	ATGAAGAAAACCAATTCACCAAT TTCACGCCGTTCTCCAATCAAAT
Phytoalexine	Cytochrome P450 79B5	Bn-CYP79 (B5)	AF453287	Naur <i>et al.</i> , 2003	CACTCCCTTCGGTGAACAAT CCTTGCATCGACGATAGGAT

mM), 2,5 µl de tampon de Taq 10X, 0,625 µl de MgCl₂, 0,25 U de Taq (NEB, MA, Boston), de 2,5 µl d'ADNc, le tout complété à 25 µl par de l'eau. L'amplification par PCR est composée de 30 cycles (30 sec à 94°C, 1 min à 56 °C, 1 min à 72°C) précédée d'une étape de dénaturation initiale de 1 min à 94°C et suivie d'une élongation finale 10 min à 72°C.

1.1.2.5. Clonage des ADNc

Un produit d'amplification destiné à être séquencé est séparé sur gel d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL) en milieu TEB frais. Le produit d'amplification est purifié à partir du gel électrophorétique en utilisant le kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen). L'amplicon purifié est ensuite ligué dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega) et cloné dans des bactéries compétentes XL1-Blue (Stratagene). Le plasmide est extrait et purifié en utilisant le kit "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen), puis séquencé par la société GATC Biotech (Allemagne).

1.1.2.6. RT-PCR quantitatives en temps réel, q-RT-PCR

Les réactions de PCR en temps réel sur matrice ADNc (RT-qPCR) sont réalisées en plaque 96 puits (AppliedBiosystem) dans un thermocycleur 7300 real-time PCR (Applied Biosystem). Chaque puits contient 5 µL d'ADNc (~5 ng équivalent ARN), 300 nM de chaque amorce (Tableau VII); 6,25 µL de tampon 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) dans un volume final de 25 µL. Les conditions d'amplification appliquées sont une dénaturation initiale de 10 min à 95°C puis 40 cycles : 95°C 15 sec, 60°C 1 min. Pour chaque expérimentation, des contrôles négatifs sans ADNc matrice sont inclus afin de détecter d'éventuelles amplifications non spécifiques. A la fin d'une réaction de q-RT-PCR, un cycle de dissociation (en augmentant la température de 60 à 95°C) permet de calculer la

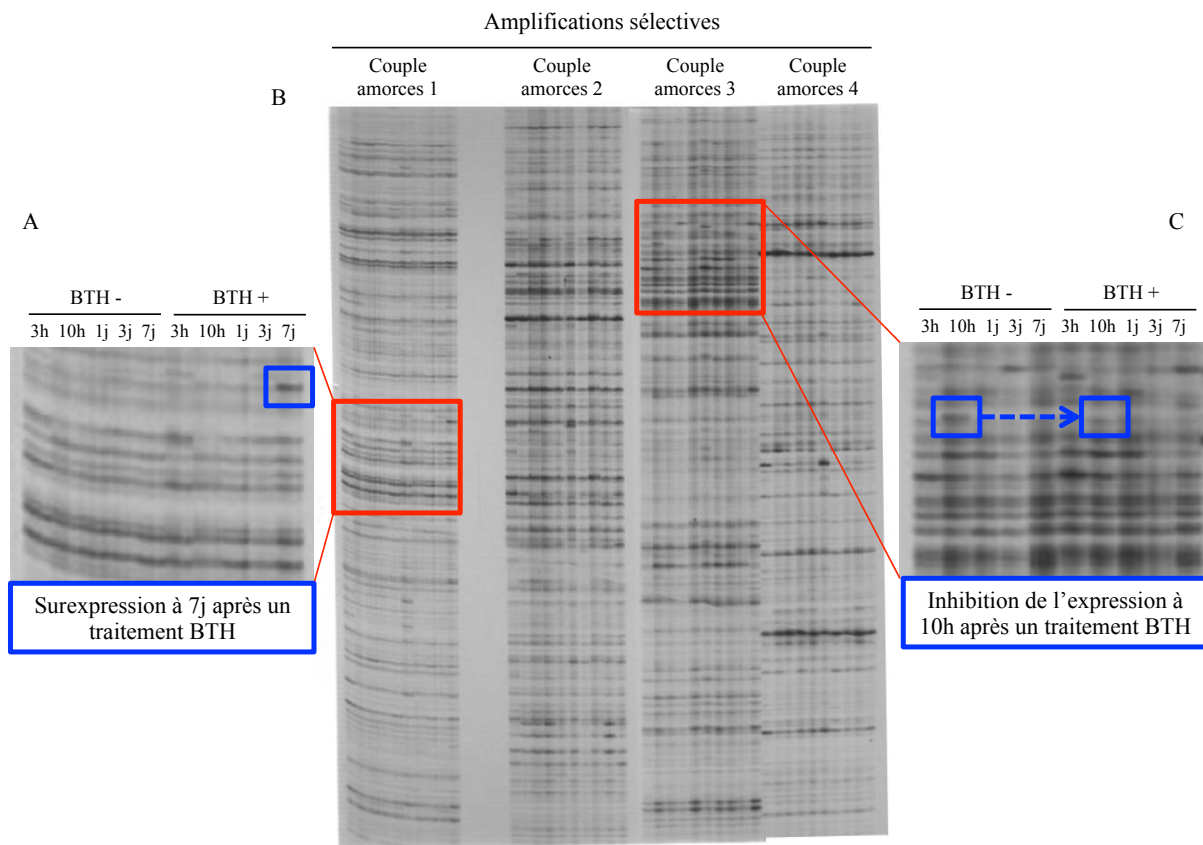


Figure 31 : Profil cDNA-AFLP type obtenu après migration sur gel de polyacrylamide des produits de PCR des fragments de restrictions des enzymes BstYI et MseI. Marquage réalisé par du γ -P³³. (A) surexpression à 7jrs d'un TDF après traitement BTH. (B) Profil type de cDNA-AFLP obtenu après migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification par PCR des cDNA, (C) une sur-expression d'un TDF à 3h après traitement BTH et expression à 10h sans traitement BTH qui est inhibée au même temps par le traitement BTH.

température de dissociation des amplicons et d'en déterminer ainsi la spécificité. Trois répétitions d'extraction d'ARNs ont été réalisées, les réactions PCR ont analysés en triplicat.

1.1.2.7. RT-PCR semi-quantitatives

Les réactions sont réalisées dans un volume de 50 µL composé de 5 µL de matrice d'ADN, 2 µL de chaque amorce 10 µM (Tableau VII), 2 µL de dNTP 10 mM, 5 µl de tampon réactionnel pour la Taq Polymerase (Tris-HCl 100 mM, KCl 1,5 M, MgCl₂ 150 mM, pH 8,3) (New England Biolabs) et 1 µL de Taq DNA Polymerase 5 U/µL (New England Biolabs). Les conditions d'amplification sont : 94°C 5 min puis 25 cycles 94°C 45sec, T_m amorces 45sec, 72°C 2min. Cinq µl de produits d'amplification sont prélevés et le reste des échantillons subit 5 cycles supplémentaires. Ceci est répété 2 autres fois. Tous les échantillons (25, 30 et 35 cycles) sont analysés sur gel d'électrophorèse d'agarose 1,5% en milieu TEB additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL).

1.2. Résultats-discussion

1.2.1. Approche non ciblée (cDNA-AFLP)

Il a été montré au préalable qu'un traitement foliaire du colza par le BTH conduisait à une réduction du nombre de fixations du parasite *P. ramosa* (Véronési *et al.*, 2009). Nous avons cherché à savoir de manière non ciblée si un traitement foliaire par du BTH avait pour effet une modification du transcriptome des racines, ce afin d'identifier des gènes et des mécanismes de défense pouvant être induits. Le caractère systémique de la réponse au BTH en direction des racines et l'induction de mécanismes de défense nous semblaient être des données intéressantes à valider dans le contexte d'une lutte contre ce parasite de racines. Globalement, un traitement foliaire par le BTH n'induit pas une expression différentielle massive du transcriptome des racines par comparaison au traitement contrôle. En effet,

Tableau VIII : Transcrits présentant une expression différentielle dans l'analyse du cDNA-AFLP

# TDF	BTH-	BTH+	Temps	BstYI T ou C +	MseI +	Taille (pb)	Séquence
TDF 7		X	7j	T+A	T	227	glycine rich protein Z14143.1
TDF 11		X	3h	T+G	A	314	Pectinacylesterase NM_111465.3
TDF 12		X	3h	T+G	A	236	<i>A. thaliana</i> LNG1 (LONGIFOLIA1) NM_121562.2
TDF 19	X		3h	C+C	T	75	ADENOSINE KINASE 2 <i>A. thaliana</i> NM_120408.3
TDF 28	X		10h	T+G	C	93	complex exocytose <i>A. thaliana</i> SEC6
TDF 29		X	10h	T+T	A	176	Protéine phosphate 2C

seulement 29 séquences (TDF, Transcript-Derived Fragment) semblent présenter une expression différentielle et ce de manière assez discrète (Figure 31). Six séquences montrant un profil d'expression avec une différence significative entre le traitement et le contrôle ont été clonées et séquencées (Tableau VIII).

Le TDF 7, présente un alignement à 78% d'homologie avec *Brassica napus BnGRP10* (e-value de 3.10^{-30}) et à 77% avec *Arabidopsis thaliana AtGRP8* (e-value de 1.10^{-29}). Ces gènes codent pour des protéines riches en glycine avec une séquence RNA-binding. Ce type de protéine est connu essentiellement pour son implication dans la régulation du feedback négatif de la boucle de l'horloge circadienne. Cependant, ces protéines interviennent aussi comme facteurs de transcriptions en réponse à l'acide abscissique ou l'acide salicylique lors de réponses aux stress tels que le stress hydrique, les attaques par les champignons et les blessures (Sachetto *et al.*, 2000, Cao *et al.*, 2006).

Le TDF 11 présente un alignement à 89% d'identité et une e-value de 7.10^{-66} avec une pectine acétyl estérase (PAE) d'*Arabidopsis thaliana*. Les PAE sont des protéines associées à la modification des parois cellulaires. Elles peuvent catalyser la déacétylation des pectines et potentiellement réguler l'assemblage des réseaux pectiques en créant des ponts calciques et en altérant l'accessibilité des pectines aux enzymes hydrolytiques. Ce gène est rapidement induit dans des racines d'*A. thaliana* après l'attaque d'un nématode (Vercauteren *et al.*, 2002). Dans notre cas, il présente également une sur-régulation rapide et transitoire en réponse au traitement au BTH. Le BTH aurait donc un effet rapide sur les parois au niveau racinaire, éventuellement en les renforçant afin d'éviter l'entrée des agents pathogènes.

Le TDF 12 correspond d'après son alignement avec les bases de données publiques au gène *lng1* (Longifolia1). Ce gène a été identifié chez *A. thaliana* et intervient dans la morphologie des feuilles en agissant sur l'élongation longitudinale des cellules (Lee *et al.*, 2006).

Le TDF 19 correspond à un gène d'*A. thaliana* codant pour une adénosine kinase 2 (ADK). Chez *A. thaliana*, les adénosines kinases 1 et 2 présentent un niveau d'expression constitutif avec un niveau élevé au niveau de la tige et des racines. L'adénosine kinase est une enzyme clé de la régulation intra- et extra-cellulaire du niveau d'adénosine en convertissant l'adénosine en AMP en utilisant un ATP (Moffatt *et al.*, 2000). L'ADK joue un rôle clé dans le cycle de la S-adénosyl-méthionine (SAM). Il fournit des groupements méthyles pour un grand nombre de réactions de transméthylations impliqués dans le métabolisme de molécules telles que la lignine, les pectines, les flavonoïdes, l'IAA, l'acide salicylique, le jasmonate. C'est également un précurseur de la biosynthèse de l'éthylène et des polyamines. Une forte inhibition de l'ADK aboutit à une inhibition des transméthylations liées à la SAM (Moffatt *et al.*, 2002). Dans notre cas, l'inhibition de l'ADK est transitoire puisque le niveau basal d'expression est retrouvé 10h après le traitement au BTH. Du fait de cette régulation transitoire, on peut penser que l'inhibition aurait un impact peu important sur la voie de la SAM.

Le TDF 28 correspond au gène SEC6 d'*A. thaliana*. Celui-ci code pour une sous-unité d'un complexe d'exocytose impliqué dans la polarisation des cellules végétatives au moment de la germination des grains de pollen (Hála *et al.*, 2008).

Le TDF 29 correspond à une protéine phosphatase 2C (PP2C) surexprimée 10h après le traitement BTH. Il a été démontré que ces protéines jouent un rôle au niveau de la régulation du développement des plantes, de la voie de signalisation de l'acide abscissique, et au niveau de l'adaptation des plantes aux stress abiotiques (Schweighofer *et al.*, 2004). Peu de travaux ont été réalisés sur l'implication des PP2Cs dans la réponse aux stress biotiques. Cependant, un gène PP2C du lotus montre une surexpression pendant l'établissement des nodules racinaires avec une bactérie, *Mesorhizobium*, ce qui indique l'implication des PP2C lors des symbioses (Kapranov *et al.*, 1999). Depuis, d'autres études ont également montré

l'implication des gènes PP2C dans la réponse aux stress biotiques. Chez *A. thaliana*, la surexpression du gène AP2C1 entraîne la diminution de la production d'éthylène et la répression des gènes de défense lors de l'interaction avec *Botrytis cinerea* (Schweighofer *et al.*, 2007). Récemment, un gène PP2C du riz a été isolé et identifié. Ce gène est induit suite à une infection par *Magnaporthe grisea*, un pathogène fongique responsable de la pyriculariose du riz, mais également suite à un traitement au BTH. La surexpression de ce gène chez un tabac permet d'augmenter la résistance aux maladies et entraîne l'expression de gènes impliqués dans la défense des plantes (Hu *et al.*, 2009).

Alors que certains de ces gènes pourraient être impliqués dans des mécanismes de défense du colza suite à un traitement BTH, une validation par q-RT-PCR n'a pas permis de confirmer leur profil d'expression observé en cDNA-AFLP. L'absence de réponse transcriptionnelle des racines à un traitement au BTH des feuilles peut être expliquée de plusieurs façons :

- Un traitement BTH unique pourrait ne pas être suffisant pour déclencher de manière assez forte l'expression de gènes dans les racines, ce qui ne nous a pas permis de les déceler plus nettement.
- Le traitement BTH des feuilles ne déclenche pas un signal systémique jusqu'aux racines conduisant à une réponse transcriptomique. Après un traitement au niveau des feuilles, la réponse systémique peut être de nature métabolomique plutôt que transcriptomique indécélable par cette technique.
- La cDNA-AFLP est une technique d'analyse transcriptomique qui n'est pas exhaustive. Les combinaisons possibles d'amorces pour les amplifications des fragments digérés par les enzymes recouvrent approximativement 75 à 80 % du transcriptome. De nombreux transcrits d'intérêts peuvent ne pas avoir été décelés par cette technique.

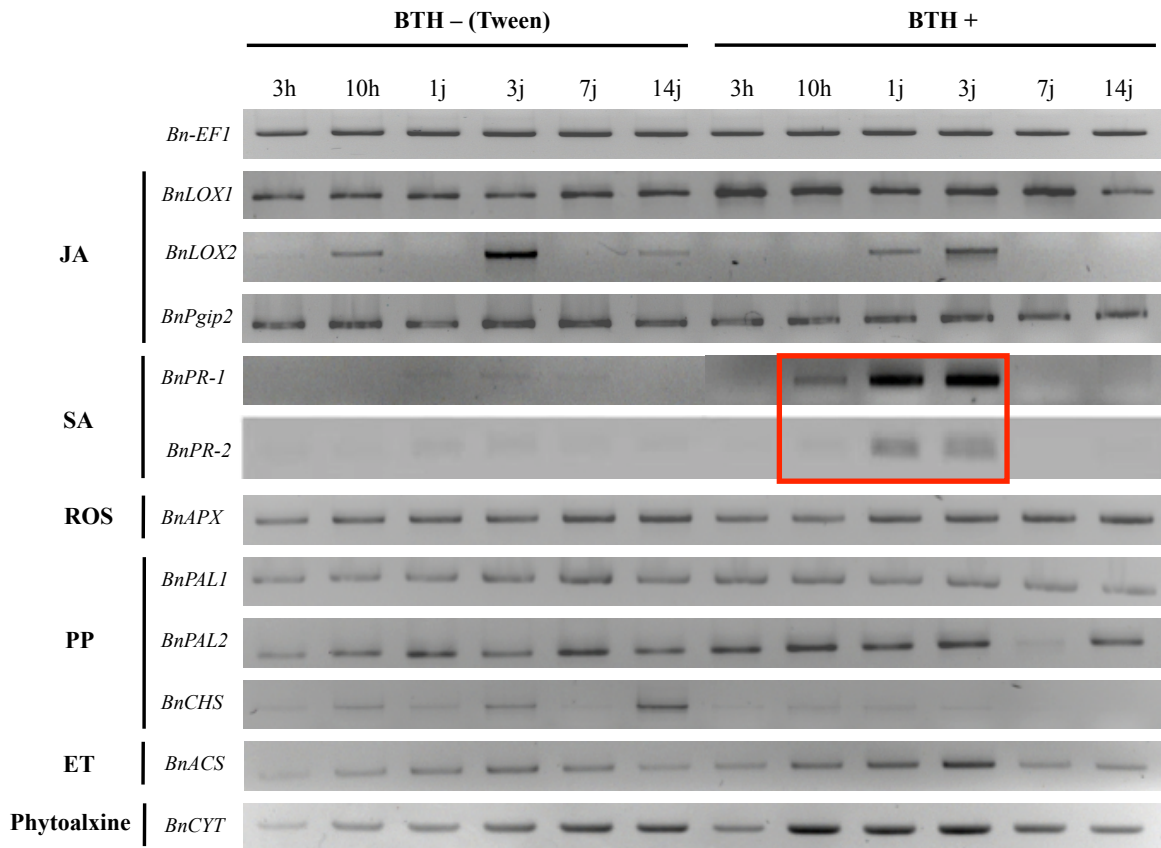


Figure 32 : Profil d'expressions des gènes marqueurs de différentes voies de défense dans les racines de colza suite à un traitement des feuilles par une solution de BTH.

BTH - : traitement par solution eau + 0,01 % Tween ; **BTH+ :** traitement par solution eau + Tween 0.01 % + BTH 0.05 g.l⁻¹

Bn-EF1 : Elongation Factor 1, gène contrôle ; **BnLOX1 et BnLOX2 :** lipoxygénase ; **BnPgip2 :** polygalacturonase inhibitor protein ; **BnPR-1 :** Pathogenesis related protein 1 ; **BnPR-2 :** β-1,3-glucanase ; **BnAPX :** Ascorbate peroxidase ; **BnPAL1 et BnPAL2 :** Phenylalanine ammonia-lyase ; **BnCHS :** Chalcone synthase ; **BnACS :** ACC synthase ; **BnCYT :** Cytochrome P450 79B5.

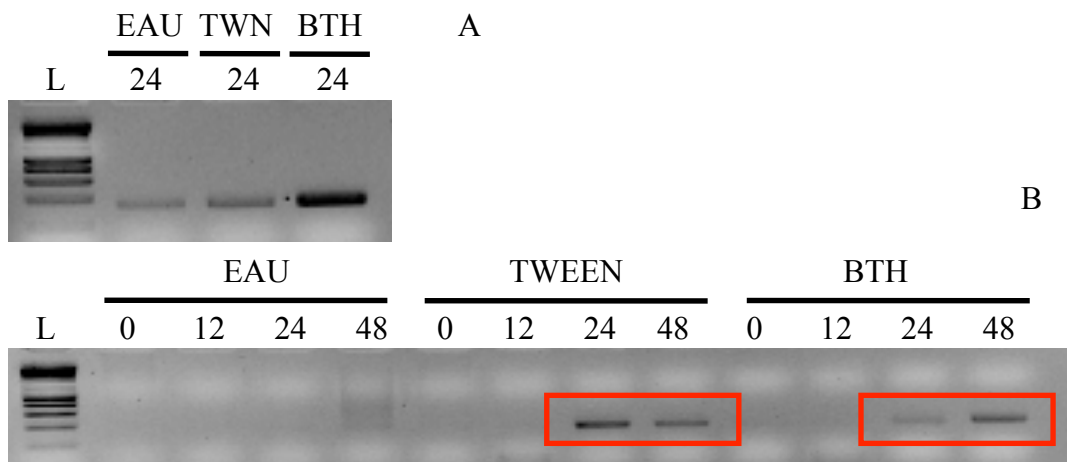


Figure 33 : Expression du gène marqueur PR-1 en PCR semi quantitative suivant un traitement BTH au niveau des feuilles (0,05g.l⁻¹ + 0,01 % Tween 20), Tween (0,01 % Tween) ou à l'eau. **(A)** dans les feuilles, **(B)** dans les racines aux temps 0h, 12h, 24h et 48h.

A ce stade de l'étude, l'approche non ciblée par cDNA-AFLP n'a donc pas permis d'expliquer la réduction du nombre de fixations observée lors des expérimentations en serre par Véronesi *et al.*, en 2009.

1.2.2. Approche ciblée

1.2.2.1. Effet d'un traitement BTH au niveau des feuilles sur le transcriptome des racines de colza

L'expression de quelques gènes marqueurs de voies de défense connues des plantes (Tableau VII) a été suivie par RT-PCR semi-quantitative dans les racines de la variété Yudal suite à un traitement foliaire au BTH (Figure 32). Cette étude a montré essentiellement une surexpression pendant les 3 jours suivant le traitement BTH des gènes marqueurs de la voie de défense de l'acide salicylique : PR-1 et PR-2. Afin de valider ce premier résultat encourageant, une répétition a été réalisée en comparant l'expression de PR-1 après des traitements « eau », « eau + Tween 0.01% », et « eau + Tween 0.01 % + BTH 0.05 g.l⁻¹ ». Dans un premier temps, l'efficacité du traitement foliaire BTH a été validée dans les feuilles (Figure 33 A). En effet, on observe à 24h une surexpression de PR-1 dans l'échantillon BTH comparé aux deux échantillons contrôles. Cependant, dans les racines, si une induction de PR-1 est bien observée suite au traitement BTH, on note aussi une plus forte induction dans les échantillons contrôle traités uniquement au Tween 20. Trois répétitions biologiques ont confirmé ce résultat surprenant. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de PR-1 dans les racines suite à un traitement BTH foliaire est essentiellement due à la présence de l'agent mouillant le Tween 20 et que le BTH n'a pas d'action systémique sur la transcriptomique des racines de colza. Il nous est ici difficile d'expliquer en revanche l'apparent effet systémique du Tween 20.

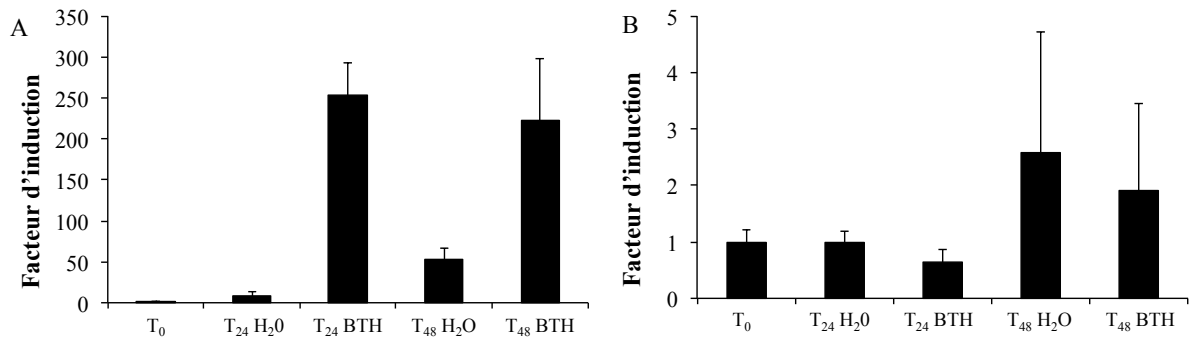


Figure 34 : Etude de l'expression de PR-1 en qRT-PCR (A) dans des feuilles et (B) dans les racines de plantules d'*Arabidopsis thaliana* traitées au niveau des feuilles. Les plantules sont traitées par pulvérisation foliaire d'une solution de BTH à 0,1g.L⁻¹ ou par de l'eau sans adjonction de tween 20. Les données représentent la moyenne ± écart type (n=9).

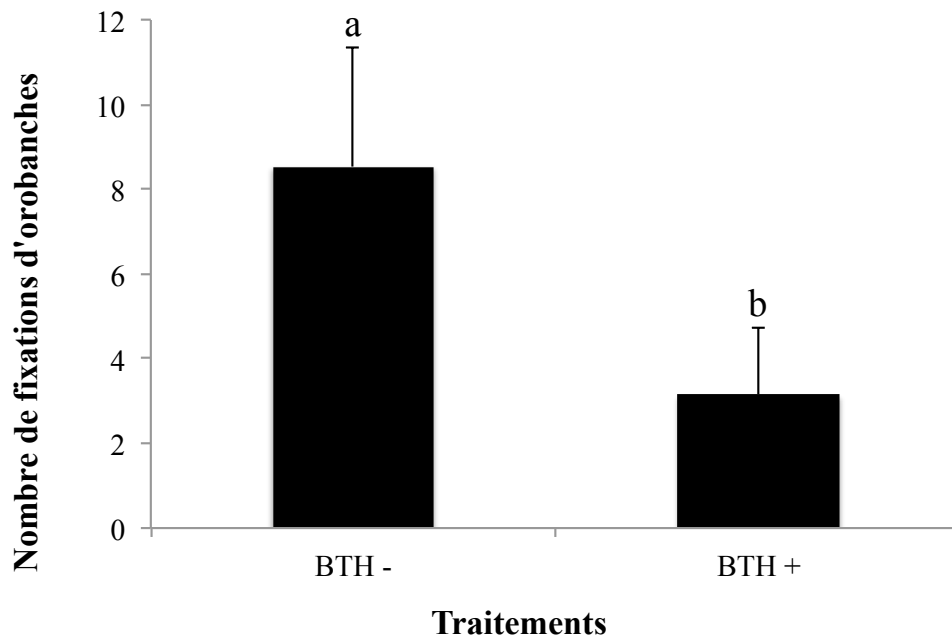


Figure 35 : Effet d'un traitement BTH sur les racines de colza et incidence sur le nombre de fixations de *P. ramosa*. Les données représentent la moyenne ± écartype de 16 répétitions biologiques. Les moyennes ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement à P<0,05 (Test SNK).

1.2.2.2. Effet d'un traitement BTH au niveau des feuilles sur le transcriptome d'*Arabidopsis thaliana*

Afin de confirmer l'absence d'effet systémique du signal BTH sur le transcriptome de racines, le même type d'expérimentations a été réalisé sur le modèle *Arabidopsis thaliana*, appartenant aussi à la famille des Brassicacées. Pour s'affranchir de la problématique Tween 20, les essais ont été réalisés en l'absence de cette molécule. On observe une expression du gène PR-1 dans les feuilles d'*Arabidopsis* à 24h et 48h après traitement comparée aux témoins (Figure 34A). De nouveau, le traitement foliaire BTH n'induit pas l'expression de PR-1 dans les racines (Figure 34B), confirmant qu'un traitement foliaire par ce SDN, ne génère pas de modifications transcriptionnelles dans les racines.

1.2.2.3. Effet d'un traitement BTH sur les racines de colza

Les approches ciblée et non-ciblée n'ayant pas permis d'identifier une réponse moléculaire des racines de colza suite à un traitement BTH foliaire, nous avons analysé l'effet direct de ce traitement sur les racines. Il faut rappeler qu'une application répétée tous les quinze jours sur des colza en serre par lessivage du substrat diminue le nombre d'orobanches fixées sur les racines (Véronési *et al.*, 2009). Dans un premier temps, cet effet a été confirmé sur des co-cultures hydroponiques. Pour cela, les racines de plantules de colza de 7 jours ont été immergées dans une solution de BTH ($0,1 \text{ g/L}^{-1}$ a.i.), puis disposées dans le système de boîte de Petri au contact de graines de *P. ramosa*. Les observations réalisées lors de cette expérience portent essentiellement sur le nombre de tubercules d'orobanche s'étant développés sur l'appareil racinaire du colza. Il apparaît que le traitement racinaire par le BTH limite le nombre de fixations d'orobanche sur les racines de l'hôte (Figure 35). Sans traitement BTH, $8,5 \pm 2,8$ fixations ont été dénombrées tandis que sur les plants traités seulement $3,1 \pm 1,6$ fixations sont présentes. Afin de rechercher une éventuelle explication à

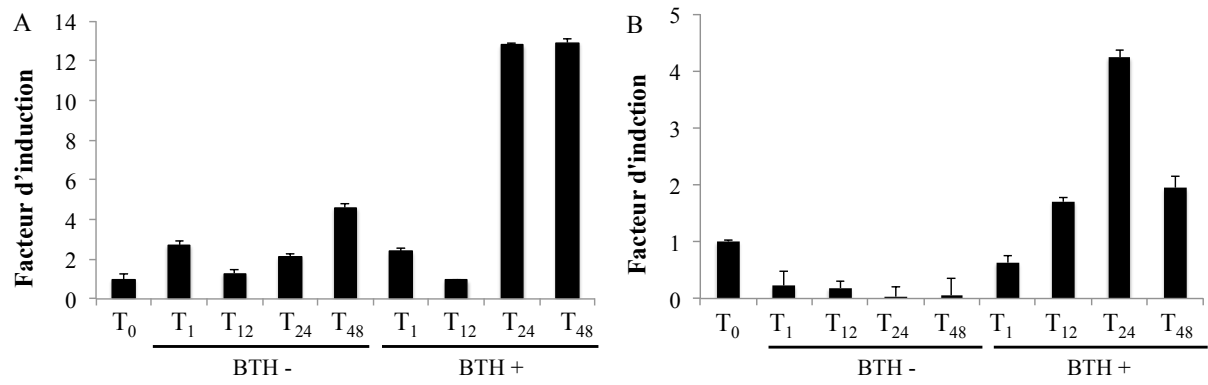


Figure 36 : Etude de l'expression de **(A)** PR-1 et **(B)** PR-2 en qRT-PCR dans des racines de colza traitées par du BTH (sans Tween 20) ou à l'eau au niveau des racines. Les données représentent la moyenne \pm écart type (n=9).

cette résistance induite, l'étude de l'expression des gènes de défense PR-1 et PR-2 a été réalisée par qRT-PCR. Les résultats montrent une induction des gènes PR-1 et PR-2 dès 24h après le traitement des racines (Figure 36). L'effet du traitement BTH sur la réduction du nombre de fixations pourrait donc être associé à l'induction de la voie de défense du SA. Pour confirmer cette hypothèse il serait intéressant d'utiliser des colzas mutants qui expriment un gène bactérien *NahG* (transgène salicylate hydroxylase) qui métabolisent l'acide salicylique en catéchol. Une étude montre que l'utilisation de ce colza possédant le transgène présente des taux réduits de transcrits de gène PR comparé aux colzas non transformés (Potlakayala *et al.*, 2007). De ce fait, en réalisant des co-cultures colzas *NahG* - *P. ramosa* il serait intéressant de voir si le nombre de fixations reste inchangé entre un colza mutant et un sauvage après un traitement par du BTH.

1.3. Conclusion

Un traitement foliaire du colza par du BTH induit une surexpression dans les feuilles des gènes marqueurs de la voie de défense du SA, PR-1 et PR2, démontrant l'efficacité du traitement. Ce même traitement induit une diminution du nombre de fixations de *P. ramosa* sur les racines de colza (Veronesi *et al.*, 2009). L'étude réalisée lors de ce travail de thèse montre que la résistance induite, médiée par un probable signal systémique généré par le BTH, ne semble pas être due à une modification du transcriptome des racines. Dans ce cas une modification métabolique dans les racines doit être envisagée. Pour répondre à cette hypothèse, des analyses protéomiques, métabolomiques et/ou histologiques devraient être conduites afin d'identifier les mécanismes conduisant à l'induction de la résistance observée. Lorsque le traitement BTH est réalisé directement sur les racines, une modification d'expression des gènes marqueurs PR-1 et PR-2 est observée (Figure 36), ce qui pourrait être alors corrélé à la diminution des fixations de *P. ramosa* (Figure 35 page 154). De nouveau,

des analyses plus approfondies devraient être menées pour mettre en évidence les acteurs de la résistance induits par le BTH.

2. Effet de la laminarine

De nombreuses études ont montré que l'application d'oligosaccharides sur les cultures augmente leur résistance à divers agents pathogènes (Coté and Hahn, 1994 ; Ebel, 1998 ; Shibuya et Minami, 2001). Parmi ces éliciteurs, la laminarine composée de β -1,3 glucanes est un inducteur des défenses des plantes stimulant les voies de défense médiées par l'éthylène (ET) (Ménard *et al.*, 2004). Cette molécule est extraite de la paroi cellulaire d'une algue brune *Laminaria digitata* (L.) Lam. En France, la laminarine est commercialisée par Goëmar (Saint Malo, France) sous le produit formulé Iodus[®] 40. Il a été démontré que la laminarine stimule des réponses de défense dans des suspensions cellulaires de tabac (Klarzynski *et al.*, 2000 ; Ménard *et al.*, 2005), chez la vigne (Aziz *et al.*, 2003), la luzerne (Cardinale *et al.*, 2000), le blé (Renard-Merlier *et al.*, 2007), ainsi que chez le riz (Inui *et al.*, 1997) par le biais de l'activation de Mitogen-activated protein (MAP) kinases, d'influx de calcium (Ca^{2+}) et de choc oxydant (Klarzynski *et al.*, 2000; Ménard *et al.*, 2005). Sur la vigne, la laminarine induit également l'accumulation de phytoalexines et induit l'expression de protéines PR (Pathogenesis related) (Aziz *et al.*, 2003). Si plusieurs études ont montré l'existence de mécanismes de défense similaires chez des espèces cultivées infestées par l'orobanche (Mabrouk *et al.*, 2007b ; Letousey *et al.*, 2007; Die *et al.*, 2009), à l'heure actuelle, l'efficacité de la laminarine pour contrôler les infestations d'orobanche n'a encore jamais été testée. C'est pourquoi, dans le cas de l'interaction colza-*Phelipanche ramosa*, l'objectif de ce travail était de déterminer si l'utilisation de la laminarine permet la potentialisation des défenses de l'hôte pour lutter contre la plante parasite, et par extension, la question posée était de savoir si les produits issus de la transformation des algues peuvent s'avérer efficaces et applicables au

champ dans un contexte de lutte phytosanitaire. Ainsi, des expérimentations en pots en serre ont été réalisées avec un traitement à la laminarine au niveau des feuilles du colza ou par traitement du sol.

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Culture en pots du colza

Les graines d'orobanche (4 mg.kg^{-1} de sol, ≈ 1250 graines) sont mélangées dans un mélange d'argile-tourbe-sable (1:1:1 v:v) dans des pots de 1,3 L. le conditionnement des graines est réalisé par recouvrement des pots pendant une semaine par une bâche opaque à 25°C . Des pots témoins quant à eux ne sont pas infestés. Trois graines de colza du génotype Yudal sont semées directement dans chaque pot. Deux semaines après l'émergence des plantules de colza, celles-ci sont éclaircies pour n'en laisser qu'une seule par pot. Les plants de colza sont alors cultivés dans une serre à $23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ éclairée par des lampes à $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ de PAR et une photopériode de 16h/8h-lumière/obscurité pendant 3 mois jusqu'à émergence des hampes florales d'orobanche.

2.1.2. Traitement laminarine

La laminarine a été appliquée soit par un traitement foliaire (aspersion) soit par lessivage du substrat. La conduite du traitement foliaire est réalisée de manière similaire aux différentes études menées par aspersion de la solution de laminarine (1 g.L^{-1}) sur des plantules de colza âgées de 2 semaines (Borges *et al.*, 2003; Parkunan *et al.*, 2011). Le traitement est appliqué sur les 2 faces de la première feuille jusqu'à ruissellement puis répété sur toutes les feuilles à 4, 6, 8 et 10 semaines après semis. La solution de laminarine ayant été appliquée en conjugaison avec un agent mouillant (Tween 20, 0,1 % V/V), les contrôles ont été traités par une solution de Tween 20 0,1% (V/V). Pour l'application par lessivage du substrat, 20 ml de

laminarine (1 g.L^{-1}) ont été ajoutés dans le sol à 2, 4, 6, 8 et 10 semaines après le semis. Dans ce cas, la solution de laminarine n'a pas été additionnée de Tween 20 ; les contrôles n'ont alors été traités qu'avec de l'eau. Dans le but d'évaluer l'impact du traitement et du parasitisme, des colzas non-infestés ont été cultivés et traités dans les mêmes conditions.

Douze semaines après le semis, les plants de colza sont dépotés. Le nombre total de fixations et la masse sèche des orobanches ont été mesurés ainsi que la masse sèche totale des plants de colza après séchage pendant 48h dans une étuve à $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Les données représentent la moyenne ($n=12$) \pm l'intervalle de confiance ($\alpha = 0,05$) ; les différences ont été testées par un test ANOVA à 1 facteur (Student-Newman-Keuls, $P \leq 0,001$; SigmaPlot 10.0).

2.1.3. Evaluation du taux de germination des graines d'orobanche

Les graines d'orobanche rameuse sont stérilisées par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel 12%) pendant 5 minutes et rincées 3 fois 5 minutes puis 3 fois une minute à l'eau distillée stérile. Vingt-cinq mg de graines (≈ 6000 graines) sont répartis sur une feuille de papier en fibre de verre humide dans une boîte de pétri $\varnothing 19 \text{ cm}$. Après une phase de conditionnement d'une semaine à l'obscurité à 25°C , les graines sont transférées dans une autre boîte de pétri $\varnothing 25 \text{ mm}$ contenant un filtre de papier de fibre de verre $\varnothing 10 \text{ mm}$ imbibé par $500 \mu\text{l}$ d'une solution de GR24 ($3,35 \text{ nM}$) ou $500 \mu\text{l}$ d'eau stérile (contrôle). Une solution de laminarine est alors appliquée sur ces 2 lots de graines à une concentration de 1 g.L^{-1} . Les graines sont alors incubées 7 autres jours à 25°C avant d'évaluer le taux de germination. Les données représentent la moyenne ($n=15$) \pm l'intervalle de confiance ($\alpha = 0,05$) ; les différences ont été testées par un test ANOVA à 1 facteur (Student-Newman-Keuls, $P \leq 0,001$; SigmaPlot 10.0).

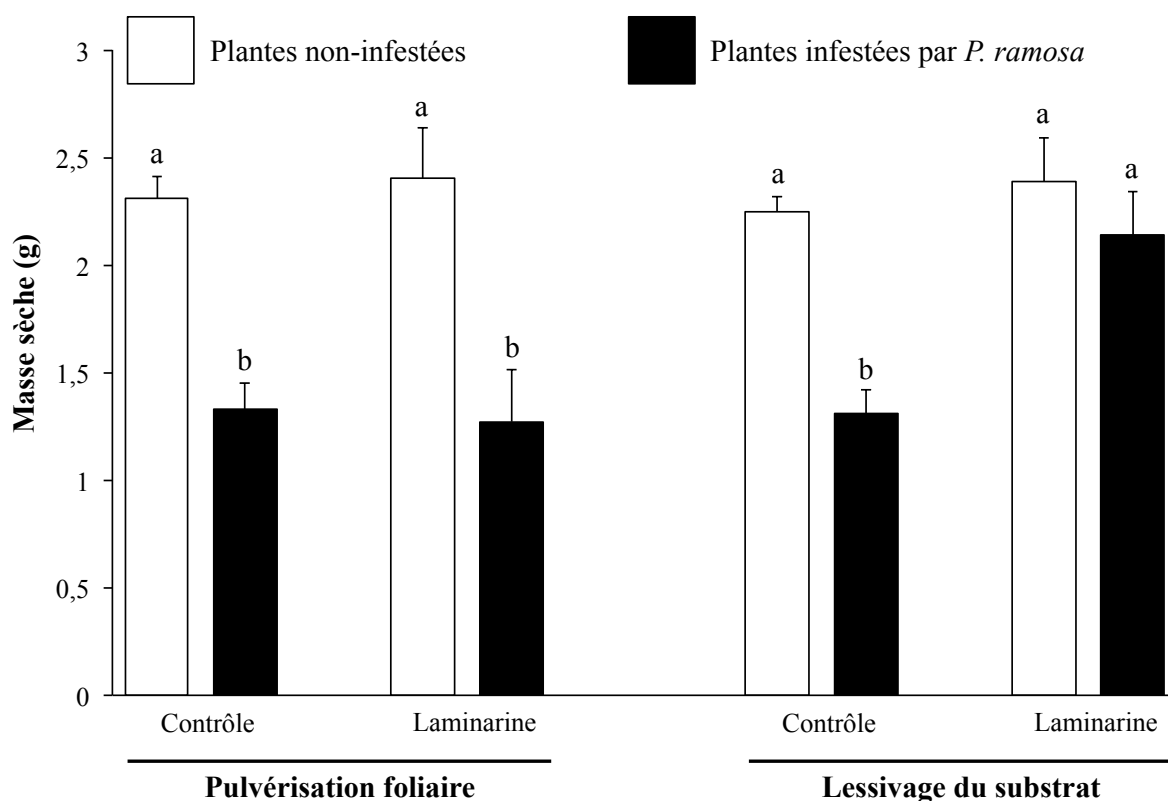


Figure 37 : Effet d'un traitement à la laminarine (1 g L⁻¹) sur la biomasse des plants de colza infestés par l'orobanche rameuse. Plants de colza Yudal non infestés (en blanc), plants de colza Yudal infestés par 1250 graines de *P. ramosa*.

Les plantes sont traitées toutes les 2 semaines par pulvérisation ou par lessivage du substrat et récoltées 12 semaines après le semis. Les données représentent la moyenne ± l'intervalle de confiance (n=12). Les moyennes avec la même lettre pour chaque type d'histogramme ne sont pas significativement différentes (Test Student-Newman-Keuls, P<0,001).

2.2. Résultats

2.2.1. Traitement foliaire de laminarine

En conditions non-infestées, le traitement laminarine ne provoque pas de modifications de la biomasse des plants de colza (Figure 37). Ceci nous permet alors d'évaluer directement l'impact de l'infestation sur les cultures traitées ou non en s'affranchissant d'un éventuel effet du traitement sur le développement du colza. A l'inverse, les plants de colza qu'ils soient traités avec la laminarine ou non, voient leur masse sèche réduite de 50 % en présence d'orobanche. Aucune différence significative du nombre d'orobanches fixées, du nombre d'orobanches émergées ainsi que de la matière sèche d'orobanches n'est observée entre les deux traitements. L'application foliaire de laminarine semble donc ne pas induire de mécanismes de défense chez le colza efficaces contre l'orobanche. Plusieurs explications peuvent être avancées : la pénétration de la molécule dans les feuilles peut ne pas être effective et/ou les signaux de défense déclenchés par le traitement ne sont pas systémiques de la partie aérienne des plantes jusqu'aux racines. En effet, chez le blé, l'effet de la laminarine observé s'opère sur des champignons (*Blumeria graminis* f. *sp. Tritici*) se développant sur les feuilles (Renard-Merlier *et al.*, 2007). La systémie ne serait alors efficace qu'au niveau de la partie aérienne.

2.2.2. Traitement par lessivage du substrat

Avant toute considération sur l'impact d'un traitement racinaire, l'effet direct de la laminarine sur les graines d'orobanche a dû être évalué. En effet dans le système en pot, l'inaccessibilité des graines d'orobanche dans le substrat ne permet pas de déterminer si l'action du traitement influe sur la germination des graines. Il a déjà été montré par Gonsior *et al.*, (2004) que l'utilisation du Fruton[®] (Goëmar, France) extrait de l'algue *Ascophyllum nodosum* L. diminuait de l'ordre de 60 % le taux de germination de l'orobanche rameuse.

Tableau IX : Effet de la laminarine sur le taux de germination des graines d'orobanches

Traitement	Taux de germination (%)
Contrôle (eau)	0 ^a
GR24 (1 µg L ⁻¹)	75.7 ^b
Laminarine (1 g L ⁻¹)	0 ^a
Laminarine (1 g L ⁻¹) + GR24 (1 µg L ⁻¹)	77.3 ^b

(Student-Newman-Keuls test, n = 15, P < 0.001). GR24: stimulant synthétique de la germination.

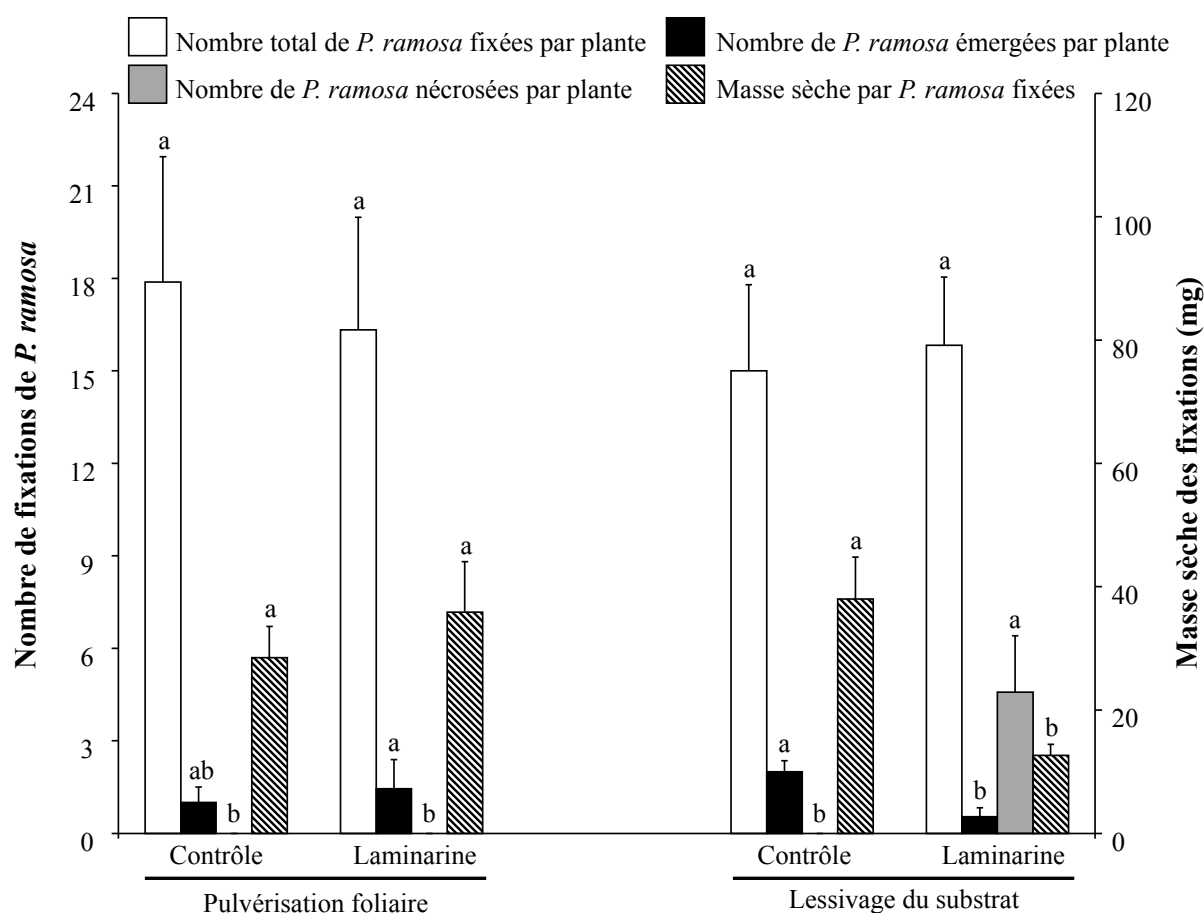


Figure 38 : Effet d'un traitement à la laminarine (1 g L⁻¹) sur l'orobanche rameuse infestant le système racinaire de plants de colza.

Les plantes sont traitées toutes les 2 semaines par pulvérisation foliaire ou par lessivage du substrat et récoltées 12 semaines après le semis. Les données représentent la moyenne ± l'intervalle de confiance (n=12). Les moyennes avec la même lettre pour chaque type d'histogramme ne sont pas significativement différentes (Test Student-Newman-Keuls, P<0,001).

Dans notre expérience, le taux de germination des graines de *P. ramosa* en présence de laminarine est de 77,3 % et n'est significativement pas différent de celui de l'essai contrôle, 75,7 % (Tableau IX). La laminarine n'affecte donc pas la capacité germinative de l'orobanche. D'autre part, ce traitement n'entraîne pas de modification de la biomasse des plants de colza non infestés ($2,3 \pm 0,1$ g pour les plantes contrôles contre $2,4 \pm 0,2$ g avec traitement laminarine) (Figure 37 page 164). En revanche, en conditions d'infestation, le traitement laminarine prévient la perte de biomasse du colza (Contrôle infesté : $1,3 \pm 0,1$ g ; Traitement laminarine infesté : $2,1 \pm 0,2$ g). En effet, alors que la biomasse des plants non traités est réduite par 2, aucune perte n'est observée pour les plants traités (laminarine non infesté $2,4 \pm 0,2$ g ; laminarine infesté : $2,1 \pm 0,2$ g) (Figure 37 page 164). Parallèlement, bien que le nombre total d'orobanches reste inchangé entre les deux traitements, la biomasse sèche d'orobanche est diminuée de 70 % et le nombre d'orobanches émergées diminue légèrement après un traitement laminarine ($38,0 \pm 6,8$ mg pour le contrôle à $12,6 \pm 1,8$ mg) (Figure 38). Cette réduction de biomasse des orobanches pourrait être expliquée par un blocage de l'accumulation des réserves du parasite. Cependant, il faut noter que 30 % des tubercules fixés nécrosent expliquant probablement cette réduction de biomasse ($4,6 \pm 1,0$ tubercules nécrosés sur $15,8 \pm 2,2$ tubercules totaux) et qu'il y a de manière plus ténue une diminution d'orobanches qui émergent du sol ($2,0 \pm 0,3$ émergences contre $0,5 \pm 0,3$) (Figure 38). Le traitement par la laminarine semble donc promouvoir des mécanismes de défense qui perturbent le développement de l'orobanche et/ou la capacité de cette plante parasite à s'alimenter en détournant les réserves de l'hôte et provoquent parfois la mort du parasite.

2.3. Discussion

Dans cette étude, l'effet d'un traitement par la laminarine a été testé sur le colza infesté par *P. ramosa*. Une application réalisée par pulvérisation sur les feuilles ne provoque

pas d'effet phytotoxique sur les plants de colza et ce type d'application semble inefficace pour protéger le colza de l'orobanche. Plusieurs études ont déjà décrit ces observations, l'application d'un traitement laminarine sur les feuilles ne déclenche que des réactions de défenses locales plutôt qu'une résistance systémique (Klarzynski *et al.*, 2000 ; Aziz *et al.*, 2003 ; Menard *et al.*, 2004 et 2005). Les essais *in vitro* ont montré que la laminarine n'affecte pas le taux de germination ou la croissance de la racine. L'incidence parasitaire, exprimée en nombre de fixations d'orobanche, reste inchangée par une application par lessivage du substrat. Ceci montre que ni la faculté germinative ni la fixation des orobanches sur les racines de l'hôte ne sont affectées par le traitement du substrat. Un traitement de fond du sol avant culture s'avérerait donc inutile. Cependant, la biomasse d'orobanches fixées est drastiquement diminuée par le traitement du substrat. Ce traitement initie une faible croissance du parasite après la fixation accompagné d'un taux de nécrose des orobanches atteignant 30 %. La laminarine n'ayant pas d'effet direct toxique sur les orobanches, cette résistance déclenchée pourrait être liée à l'activation de mécanismes de défense dans les racines. Ces types de résistance qui impliquent une limitation du développement du parasite, mais pas sa fixation ainsi que l'induction de nécroses ont déjà été reporté chez le tournesol infesté par *O. cumana* (Labrousse *et al.*, 2001 ; Letousey *et al.*, 2007) et chez la vesce (Fernandez-Aparicio *et al.*, 2008), *Medicago truncatula* (Lozano-Baena *et al.*, 2007), et la lentille (Fernandez-Aparicio *et al.*, 2009) infestées par *O. crenata*. Chez la vesce, la résistance semble être associée à l'occlusion des vaisseaux de l'hôte par du mucilage bloquant l'apport de substances nutritives vers le parasite (Perez-de-Luque *et al.*, 2006). Une occlusion du xylème a aussi été reportée chez des accessions de tournesol résistant à *O. cumana* (Labrousse *et al.*, 2001). Dans cette étude, le traitement laminarine par le sol semble inhiber significativement le développement de l'orobanche, un puits supplémentaire compétitif pour la plante hôte, par des mécanismes qui restent à clarifier. Alors que plusieurs études ont déjà

rapporté l'effet bénéfique d'un traitement par la laminarine contre des agents pathogènes fongique ou bactérien, ce travail montre que la laminarine est aussi efficace contre la pathologie orobanche. Cependant ces résultats nécessitent des études plus approfondies pour analyser l'effet et l'action du traitement par le sol des racines de l'hôte tant au niveau transcriptomique que métabolomique. De plus avant d'être applicable au champ, des études devront être menées dans le développement de méthode de traitement des parcelles infestées par l'orobanche rameuse tel que l'enrobage des semences.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Du fait de l'inquiétude grandissante des agriculteurs à propos de *Phelipanche ramosa* sur colza en France, le Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux et du chanvre (CETIOM) a demandé au Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales (LBPV) de l'Université de Nantes de lui apporter son expertise sur cette interaction. La caractérisation de cette interaction a fait l'objet de très peu d'études à ce jour (Sobrin-Vesperinas *et al.*, 1982 et 1985 ; Buschmann 2005 ; Zehhar *et al.*, 2003), et a montré que l'ensemble des colzas testés dans les expérimentations au champ présentait une gamme de sensibilité à *P. ramosa*, mais aucun d'entre eux ne présentait une résistance totale. Fort de ce constat, nous avons entrepris l'étude et la caractérisation des composantes de la résistance du colza vis-à-vis de cette plante parasite.

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement de 10 génotypes de colza infestés par *P. ramosa*. Toujours en accord avec les travaux de Sobrin-Vesperinas *et al.* (1982 et 1985), de Buschmann *et al.* (2005) et de Zehhar *et al.* (2003), aucun de nos génotypes n'a présenté un caractère de résistance totale face à cette orobanche. Cependant comme chez d'autres pathosystèmes tels que tournesol-*O. cumana*, légumineuses-*O. foetida/O. crenata* ou encore tomate-*P. aegyptiaca*, nous sommes parvenus à identifier plusieurs caractères de résistance partielle chez le colza qui sont en accord avec la bibliographie.

Le premier caractère de résistance est lié à l'induction de la germination des graines de *P. ramosa* par les exsudats racinaires de la plante hôte. En effet, en conditions hydroponiques, le taux de germination des graines de *P. ramosa* varie selon le génotype de colza. Ceci est probablement dû à un différentiel dans la quantité de strigolactone produit par les différents génotypes. Cependant, si les strigolactones sont les composés majoritairement connus pour

induire la germination des graines des plantes parasites, ceux-ci auraient un rôle secondaire dans la germination des graines de *P. ramosa* en conditions naturelles d'infestation du colza. En effet, le colza produit des glucosinolates qui une fois sécrétés dans la rhizosphère sont, sous l'action de myrosinases de la plante ou de la microflore, dégradés pour une part en isothiocyanates (ITC) connus pour être des molécules provoquant la germination de *P. ramosa* (Virtue *et al.*, 2006 ; Auger *et al.*, 2011) et *P. aegyptiaca* (Auger, comm. Pers.). La stratégie consistant à créer des géotypes non producteurs de strigolactones ne peut donc être envisagée. La sélection du colza a longtemps été orientée vers la création de variété « double 0 » (0 % acide érucique, 0 % glucosinolate) dans les graines mais pas dans la plante entière. Les données issues de nos travaux pourraient orienter la sélection vers la création de géotypes faiblement producteurs de glucosinolates dans la plante pour limiter l'induction de la germination des graines d'orobanche. Cependant ces glucosinolates sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes puisque les ITC ont une action biocide sur les agents pathogènes des plantes et sur les herbivores (Rask *et al.*, 2000). Malgré tout, les expérimentations réalisées en hydroponie, permettant de s'affranchir partiellement de la microflore du sol, ont permis de mettre en évidence des inductions de la germination variables en fonction des géotypes testés, classés de peu inducteurs (Darmor) à fortement inducteurs (Cooper). Ces variations sont probablement dues, dans ces conditions, à des productions de strigolactones qualitativement et quantitativement différentes. Si ce caractère ne peut être exploité aux champs, il s'agit là d'un bon modèle d'étude pour mieux comprendre la biologie de ces strigolactones : quelle est la génétique de leur voie de biosynthèse chez le colza ? Quelle est plus précisément la nature de ces molécules ? Quels impacts ont différents régimes de fertilisation du colza sur leur production ?

En second point, nous avons mis en évidence un différentiel du nombre de fixations de tubercule d'orobanche sur les appareils racinaires des 10 géotypes testés au laboratoire.

Grâce aux expériences en pots en serre et en hydroponie sous faibles et fortes pressions parasitaires, il s'avère que certains génotypes sont moins sensibles que d'autres à l'attaque par l'orobanche. Les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus dans l'interaction colza-*P. ramosa*, mais les études précédentes réalisées sur d'autres interactions laissent présager l'implication de mécanismes de résistance proches de ceux déjà connus. On peut ainsi proposer que ces mécanismes soient liés à des renforcements pariétaux au niveau des tissus racinaires de la plante hôte, comme des dépôts de callose, la sécrétion de mucilage ou encore la lignification des parois des cellules (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006 ; Pérez-de-Luque *et al.*, 2005b ; Pérez-de-Luque *et al.*, 2006b ; Lozano-Baena *et al.*, 2007) empêchant le parasite d'établir les connexions vasculaires avec l'hôte. Bien évidemment, il faudrait envisager d'étudier de manière plus approfondie ces hypothèses afin de les valider.

La troisième composante de la résistance du colza intervient plus tard lorsque l'interaction est établie entre le colza et *P. ramosa*. Ainsi, certains génotypes de colza comme Shakira induisent un retard de croissance des orobanches fixées sur l'appareil racinaire. Les orobanches restent bloquées au stade tubercule avec racines adventives (stade 3). Alors que les orobanches ne cessent pas d'accumuler des réserves, les bourgeons développés ne débourrent pas ou peu et présentent alors une hampe florale grêle (Figure 29 page 106). Ceci est également mis en évidence dans d'autres travaux menés avec *O. crenata* sur *Vicia* spp. (Sillero *et al.*, 2005b ; Fernandez-Aparicio *et al.*, 2009). Ce mécanisme de résistance partielle pourrait être lié à une dérégulation de la balance hormonale et de la force de puits de l'orobanche induite par l'hôte (Péron *et al.*, 2010).

Mes travaux de thèse dont les objectifs étaient d'étudier la résistance du colza vis-à-vis de l'orobanche ont donc permis d'identifier trois composantes d'une résistance partielle. L'obtention d'un génotype totalement résistant aurait bien évidemment facilité cette étude et permis de caractériser plus précisément les mécanismes moléculaires mis en jeu. Selon



Figure 39 : Constatation de Van Valen sur l'évolution et l'extinction des espèces imagée par une scène de « de l'autre côté du miroir » de Lewis Carroll.

« Mais, Reine Rouge, c'est étrange, nous courons vite et le paysage autour de nous ne change pas ? » Et la reine répondit : « Nous courons pour rester à la même place. »

l'hypothèse de la Reine Rouge de Van Valen (1973) (Figure 39), « l'évolution permanente d'une espèce est nécessaire pour s'adapter aux évolutions des espèces avec lesquelles elle co-évolue ». Dans l'interaction entre le colza et *P. ramosa* les deux partenaires n'ont peut-être pas encore développé les armes suffisantes pour lutter efficacement l'un contre l'autre. En partenariat avec l'UMR IGEPP (Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes) de l'INRA de Rennes, le criblage de ressources *Brassica* est actuellement mené afin d'identifier chez des espèces voisines sauvages des résistances. Parallèlement, une étude du comportement de la descendance du croisement Darmor x Shakira pourrait être réalisée, la perspective étant l'obtention d'un idéotype présentant les trois composantes de la résistance identifiées lors de cette étude. Une approche de cartographie de QTL sur la descendance pourrait en effet permettre d'identifier d'éventuels acteurs moléculaires de ces composantes de la résistance du colza. La difficulté résidera essentiellement dans le criblage d'un nombre important de descendant. D'autre part, le génotype Darmor est intéressant car il cumule deux composantes de cette résistance (une faible induction de la germination des graines d'orobanches et un faible nombre de fixations d'orobanche sur son appareil racinaire). Il serait ainsi intéressant d'étudier de manière plus approfondie son profil GLC/ITC conduisant à un faible taux d'induction de la germination du parasite et de le comparer à ceux de génotypes stimulants fortement la germination. Cette étude permettrait d'établir le profil des GLC à sélectionner dans les nouveaux génotypes de colza afin de limiter l'induction de la germination de l'orobanche. En second lieu, le génotype Darmor s'est avéré intéressant puisqu'il supporte moins de tubercule d'orobanche. Une étude histologique au niveau du point de fixation des orobanches pourrait être envisagée dans le but d'identifier les mécanismes conduisant à cette limitation des fixations. Cette étude viserait à rechercher la mise en place de barrières à la fixation au niveau du cortex, du cylindre central, ou des vaisseaux conducteurs. Enfin, lorsque les données concernant le génome du colza seront

disponibles, il serait intéressant de comparer les transcriptomes de racines de Darmor infestées ou non par l'orobanche à ceux de génotypes non résistants. Cette approche faisant appel à des outils de type puce à ADN (microarray) ou séquençage massif (RNAseq) permettrait alors d'identifier les acteurs moléculaires de cette composante de la résistance de Darmor.

Le génotype Shakira quant à lui tend à provoquer le ralentissement du développement de l'orobanche. Les travaux de Péron (2010) ont conduit à l'hypothèse d'une régulation par l'hôte de la balance hormonale du parasite bloquant la transition stade 3 - stade 4. Un programme de recherche visant à élucider la régulation hormonale entre l'hôte et le parasite serait intéressant à mettre en place.

Parallèlement à cette approche d'une recherche de composantes d'une résistance naturelle, nous avons cherché à induire des résistances chez le colza grâce à un traitement par un composé stimulateur des défenses naturelles (SDN), le BTH. D'après des études réalisées au préalable (Veronesi *et al.*, 2009 ; Pérez-de-Luque *et al.*, 2004), il a été montré qu'une pulvérisation foliaire d'une solution de BTH induit la diminution du nombre de fixations d'orobanches sur les racines de colza et de pois. A partir de ce constat, nous nous sommes proposé d'explorer le transcriptome des racines du colza suite à un traitement foliaire de BTH afin d'identifier des gènes présentant une régulation transcriptionnelle dont le rôle aurait été associé à des mécanismes de défense et donc à la résistance observée. Ces gènes candidats auraient pu servir au développement de résistances dont les mécanismes auraient été étudiés dans un premier temps chez la plante *A. thaliana*. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à démontrer que le signal induisant la diminution du nombre de fixations a un impact sur le transcriptome des racines. En effet, les analyses non ciblées et ciblées développées n'ont pas révélé de transcrits présentant des expressions différentielles. Seule

l'induction de l'expression du gène marqueur de la voie du SA et de la résistance systémique acquise (SAR), PR-1, a pu être mise en évidence montrant que le traitement BTH s'avère efficace uniquement sur les tissus directement traités (Figure 33 page 152, 34 page 154 et 36 page 156).

En ce qui concerne la laminarine, l'effet de cette molécule issue de la transformation d'algue a un effet relatif sur les cultures de colza infestées par l'orobanche. Bien que le traitement ne soit pas efficace totalement, il prévient la perte de biomasse de l'hôte et diminue le nombre d'émergences d'orobanche. Cependant, ces effets ne sont observables qu'après traitement du sol et non pas suite à un traitement foliaire. Un tel mode de traitement du sol rend l'emploi de cette molécule difficilement envisageable en conditions naturelles. Un traitement des semences par la laminarine pourrait être envisagé mais l'efficacité d'un tel traitement serait probablement faible puisque l'effet de la laminarine dans les expériences menées lors de ce travail ne se révèle qu'après répétition de l'application de la molécule. Il va de soi que l'utilisation de produits phytosanitaires « verts » ne peut pas se substituer aux techniques classiques de désherbage. L'efficacité en tant que telle de molécules SDN dans la lutte contre les agents pathogènes des plantes reste à ce jour limitée et probablement difficilement applicable à grande échelle dans le cadre de la lutte contre l'orobanche au champ. Cette démarche peut néanmoins s'avérer pertinente dans le cadre du développement d'une lutte intégrée contre l'orobanche associant l'application de composés SDN, l'utilisation de génotypes résistants (CLEARFIELD) associés à un herbicide dont les doses pourraient être diminuées, et l'utilisation de pratiques culturales adaptées (rotations de cultures, intercropping, semis tardifs).

Le programme de recherche développé par le LBPV sur l'interaction colza-*P. ramosa* a constitué l'essentiel de mon travail de thèse. Malgré le caractère exploratoire de cette étude

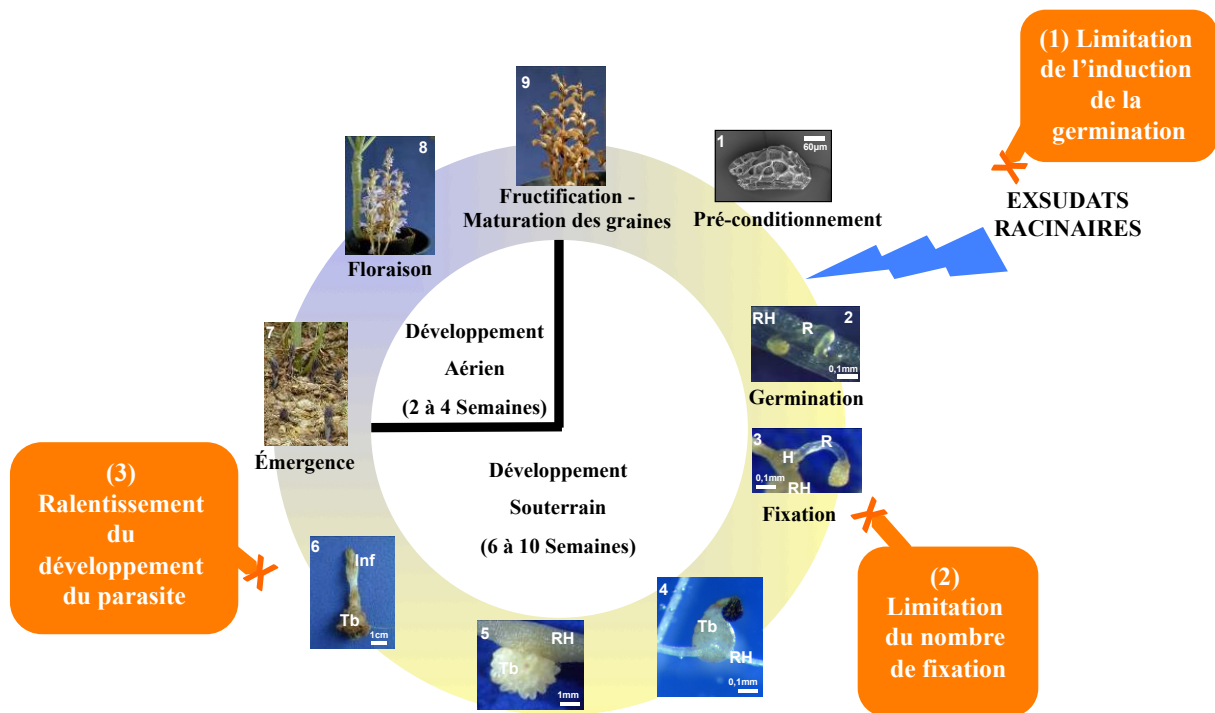


Figure 40 : Mécanismes de résistance mis en évidence chez le colza infesté par *P. ramosa*.

et les difficultés rencontrées, le bilan que j'en retire est plutôt positif puisque l'axe majeur de cette recherche visant à identifier et caractériser des mécanismes de résistance a abouti à la mise en évidence de trois composantes de la résistance du colza : une faible induction de la germination des graines d'orobanche, une limitation du nombre de fixations sur les racines, et un retard de développement des tubercules fixés (Figure 40). Désormais nous disposons de données pour envisager la mise en place de programmes de sélection de génotypes cumulant plusieurs de ces résistances. Enfin, même si le criblage des ressources *Brassica* peut s'avérer long et fastidieux, cette approche est prometteuse pour découvrir des mécanismes de résistance dans les espèces sauvages ou apparentées.

Annexes

ANNEXE I : Cinétique de fixation et de développement de *Phelipanche ramosa* sur les 10 géotypes de colza testés en montage en hydroponie pour l'analyse de leur comportement face à une infestation par l'orobanche.

Pour toutes les cinétiques :

Stade de développement de *P. ramosa* : **jaune**, stade 1 ; **orange**, stade 2 ; **rouge**, stade 3 ; **vert**, stade 4 ; **violet**, stade 5 ; **noir**, tubercules nécrosés.

Stade 1 : graine d'orobanche germée et début de fixation sur l'appareil racinaire de l'hôte,

Stade 2 : graine d'orobanche fixée et formation d'un petit tubercule,

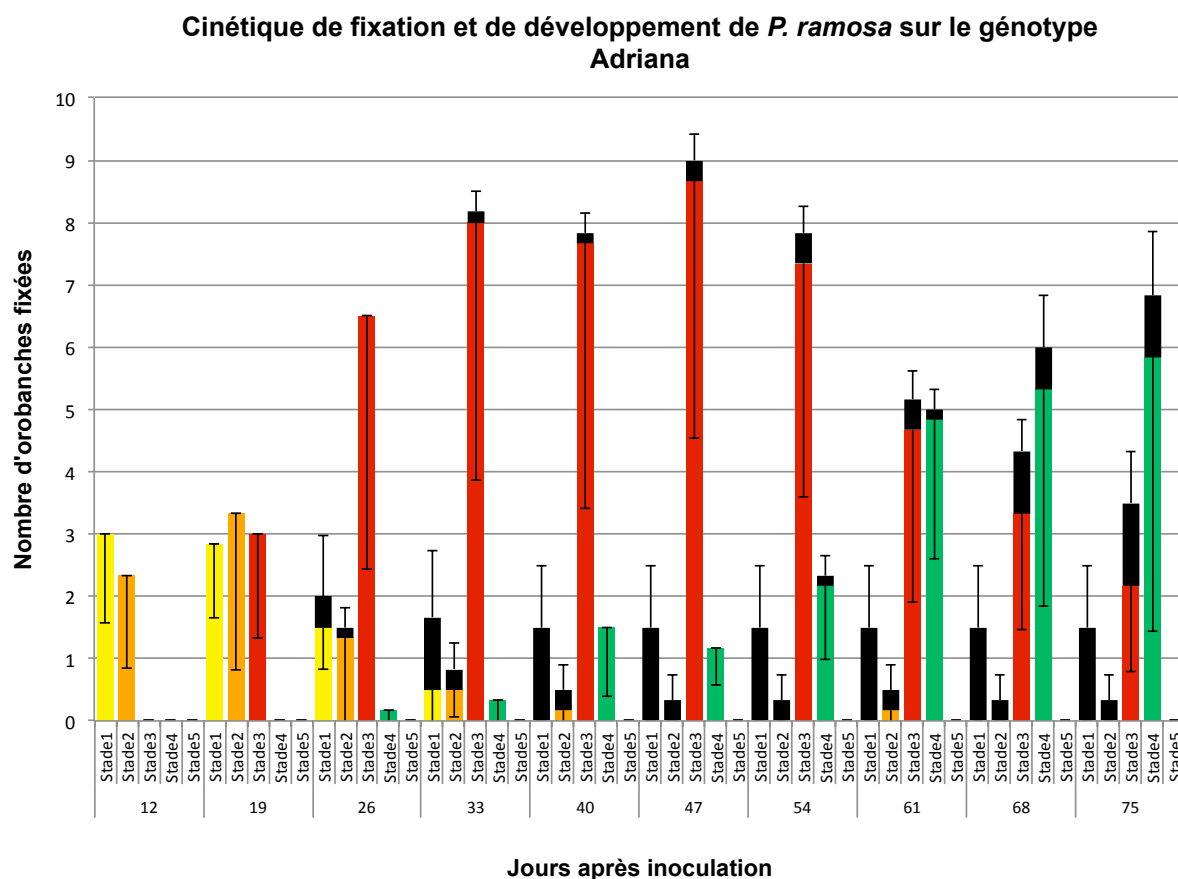
Stade 3 : apparition de racines adventives sur le tubercule, appelé stade « araignée »,

Stade 4 : bourgeon apical visible sur le tubercule ($\geq 1,5$ mm longueur) et début de formation de la hampe florale,

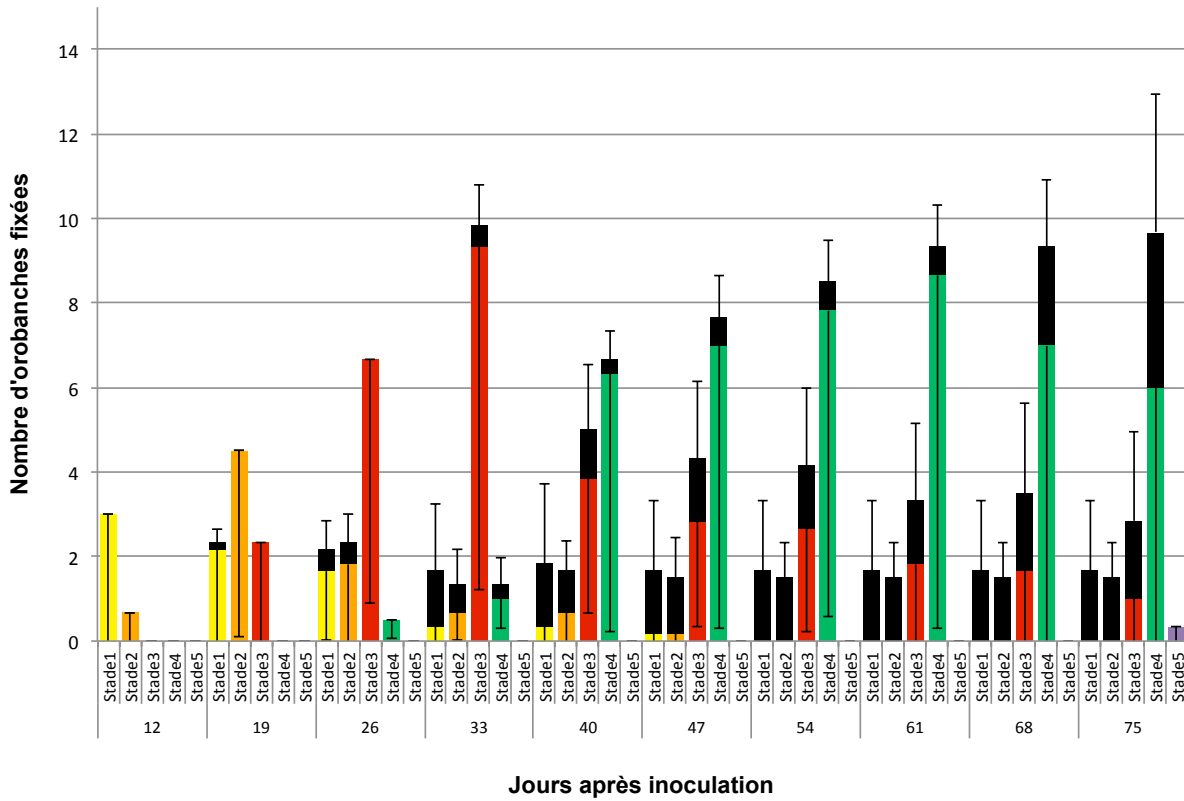
Stade 5 : hampe florale portant des fleurs.

Les barres noires vers le bas représentent l'écart type des tubercules viables fixés sur les racines (n=20).

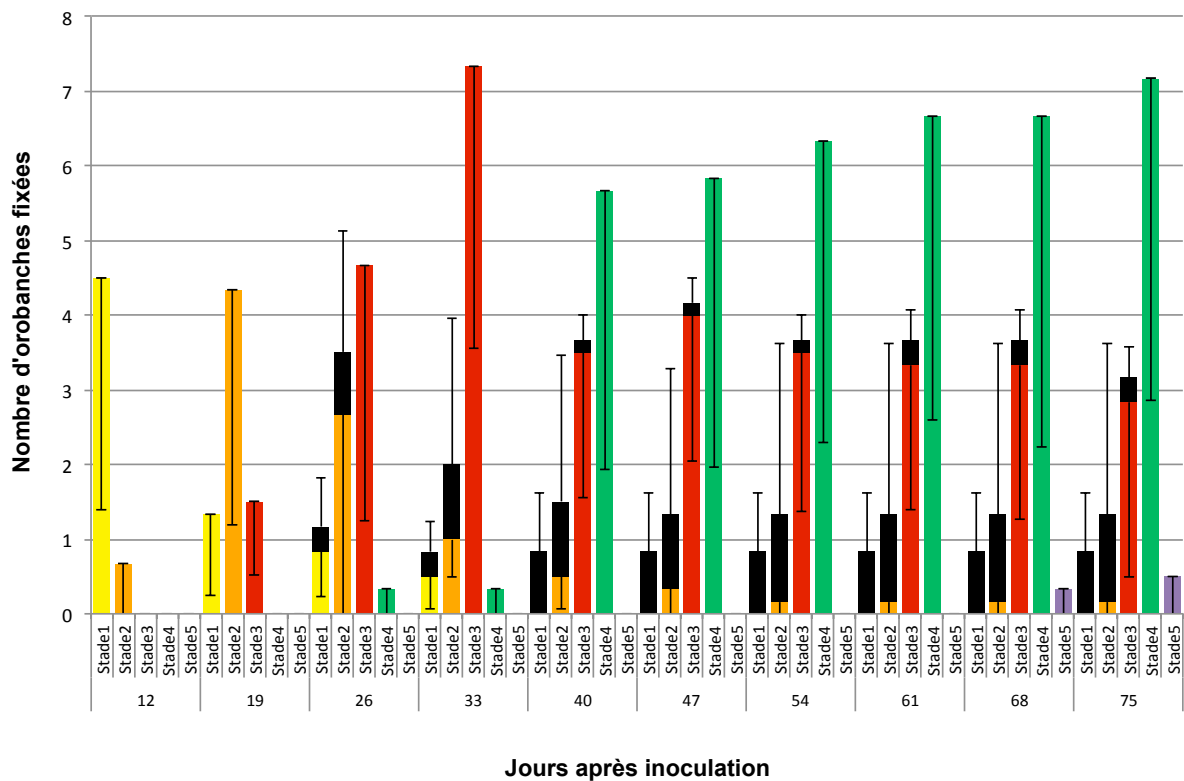
Les barres noires vers le haut représentent l'écart type des tubercules nécrosés fixés sur les racines (n=20).



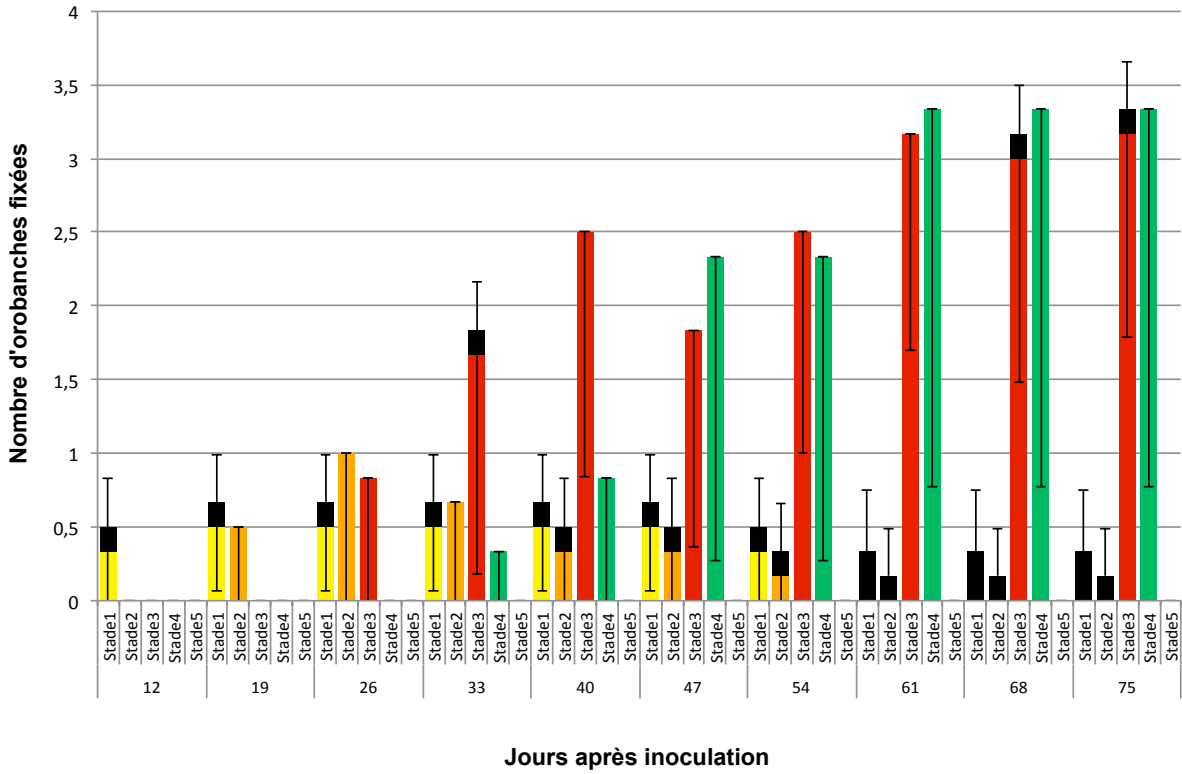
Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Alesi



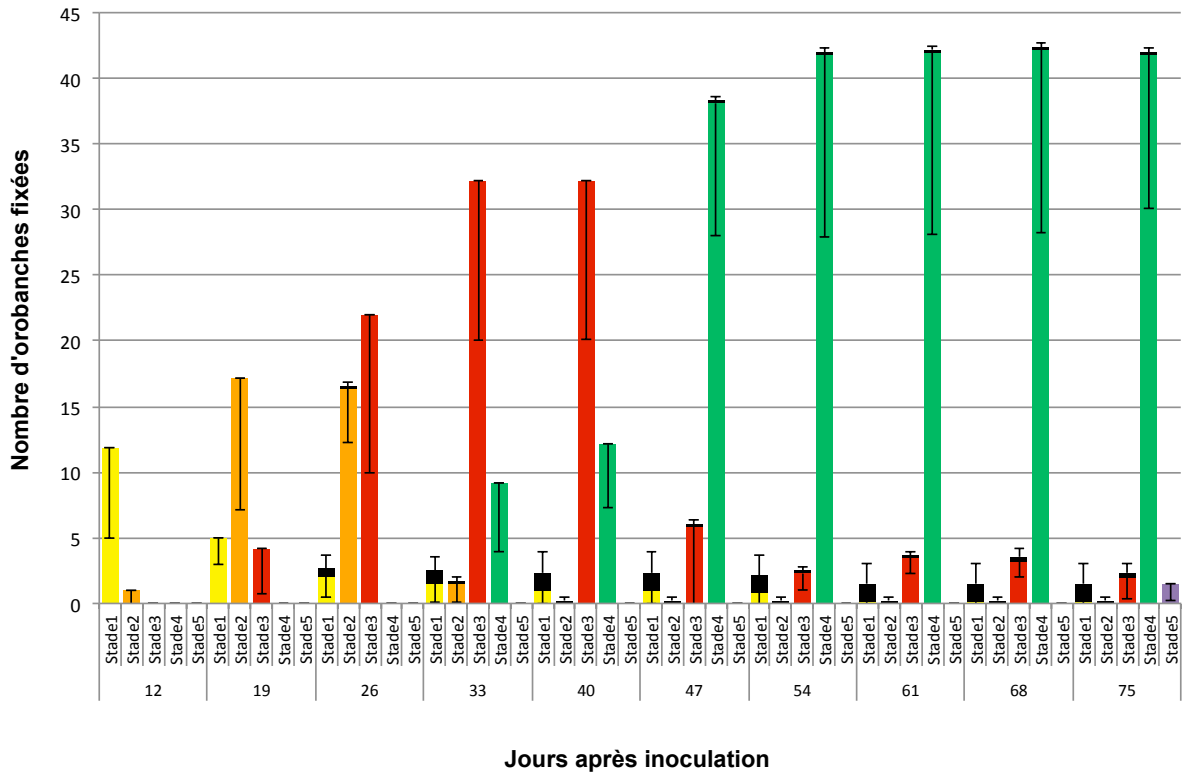
Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Aviso



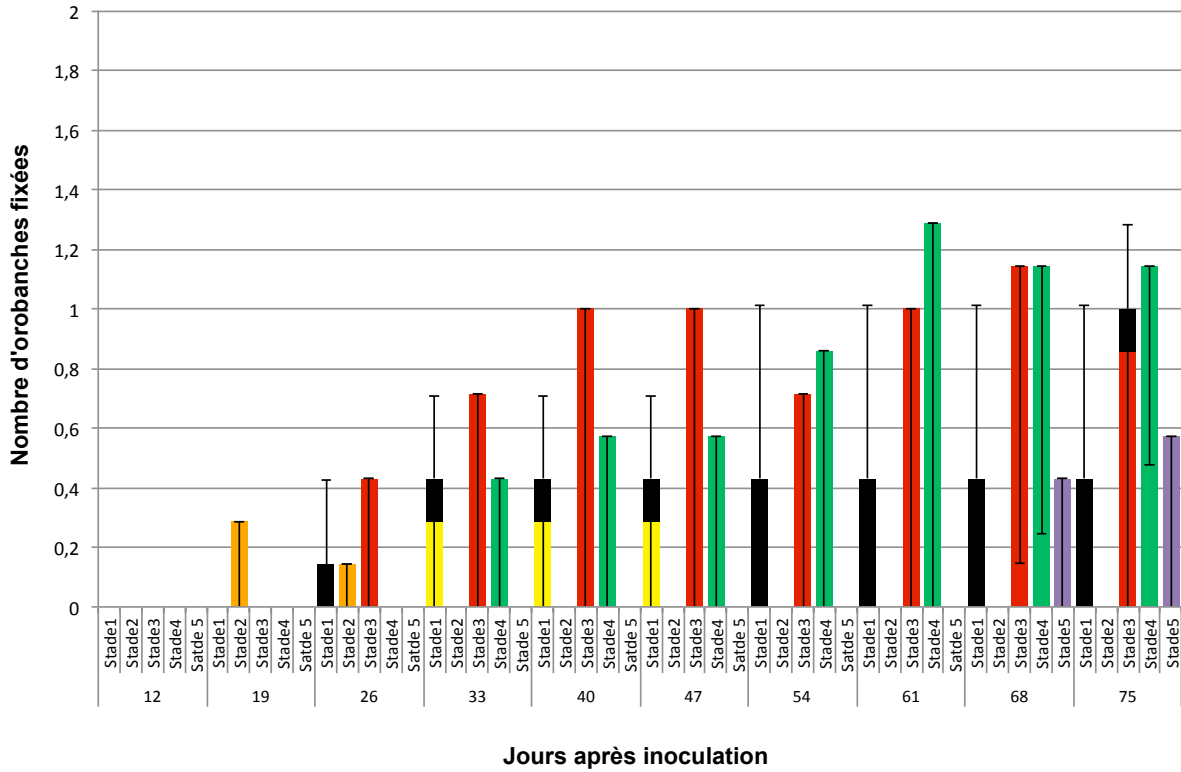
Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Campo



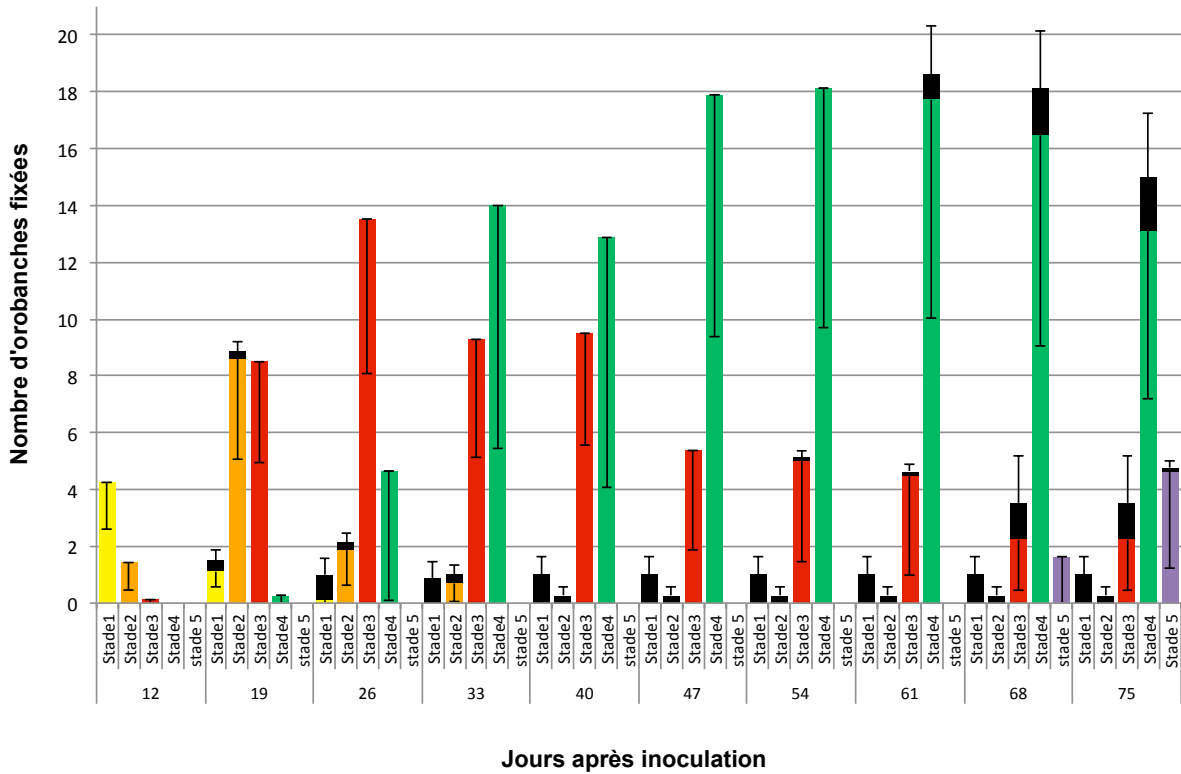
Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Cooper



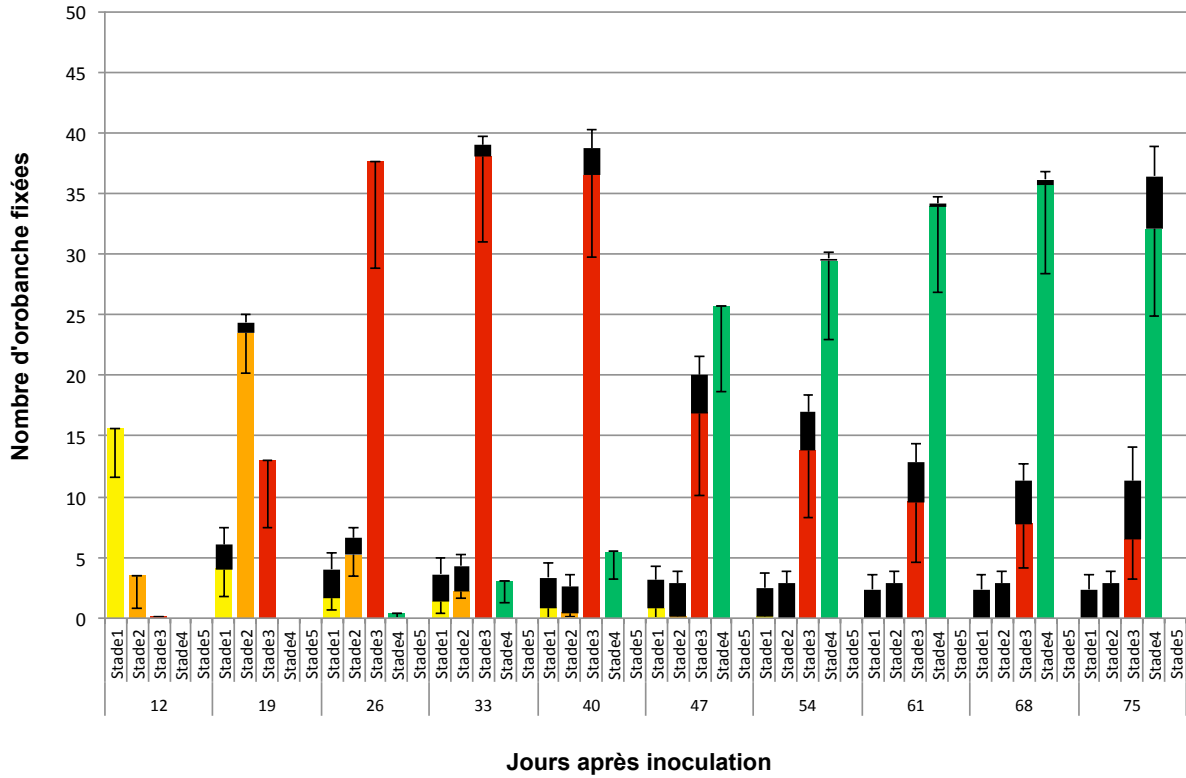
Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Darmor



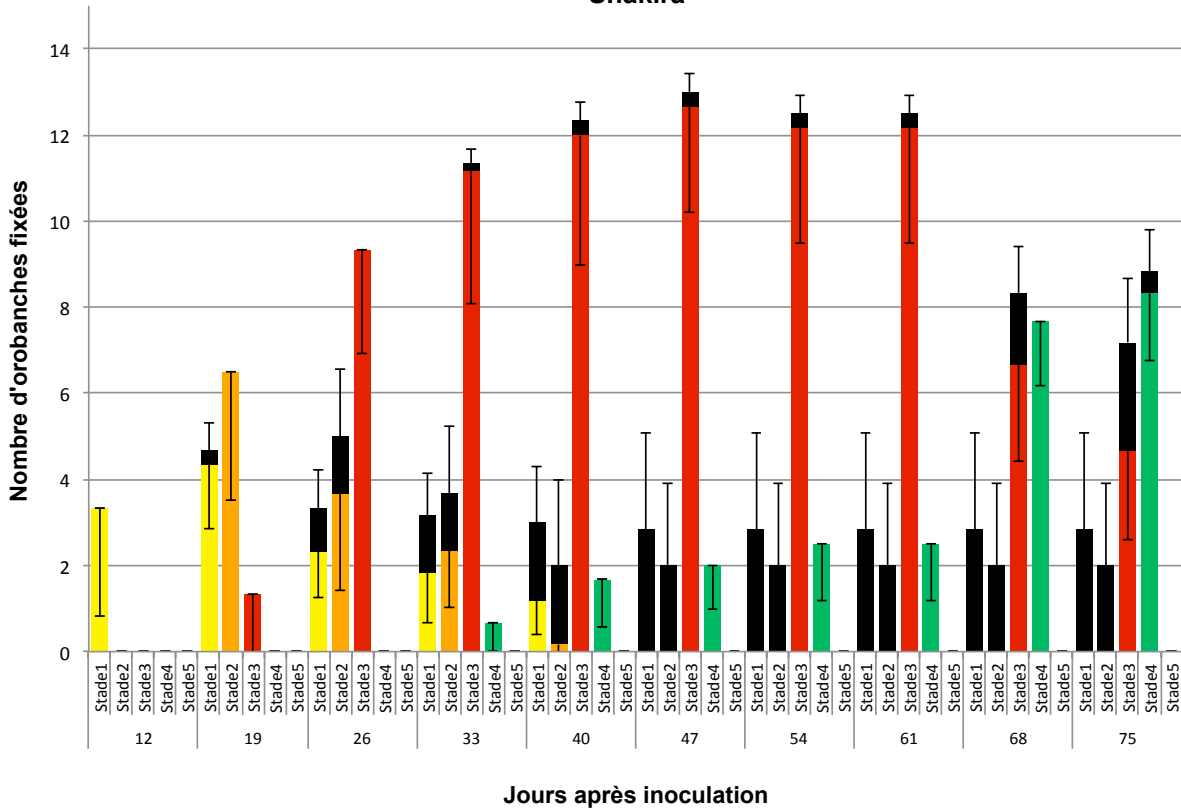
Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Expert



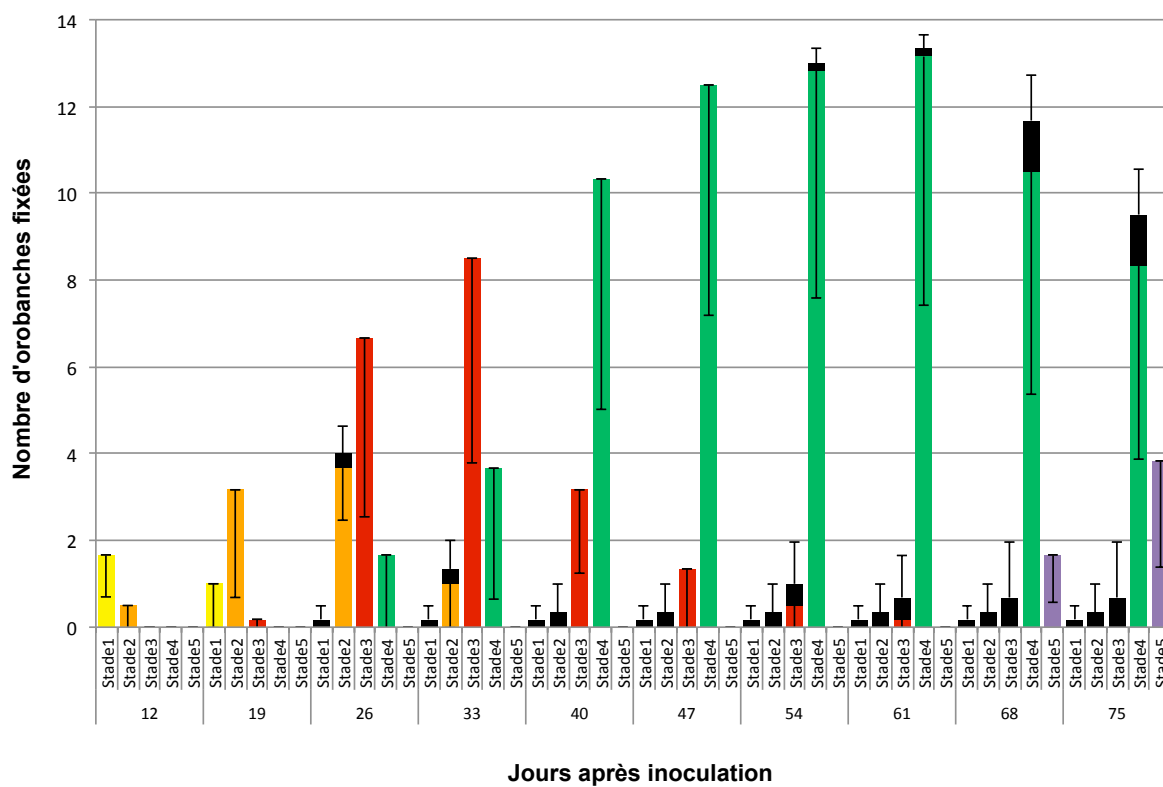
Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Grizzly



Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le génotype Shakira



Cinétique de fixation et de développement de *P. ramosa* sur le géotype Yudal



Références bibliographiques

SITOGRAFIE

CETIOM : Les oléagineux en chiffres : <http://www.cetiom.fr/>

FAO STAT : <http://faostat.fao.org/>

AMSOL : <http://www.amsol.asso.fr/>

PROLEA : Les produits / La chimie verte : <http://prolea.com>

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

RAPPORTS D'ACTIVITES

- USDA, Oilseeds and Products Annual, Modest Rebound in EU-27 Oilseeds Production, Avril 2011
- ADEME, Etude du marché Français des biolubrifiants, note de synthèse, Février 2004
- AMSOL, syndicat professionnel des semenciers de plantes oléoprotéagineuses. Colza : la culture aux nombreux avantages, Juillet 2001.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- *A* -

ABBES Z., KHARRAT M., DELAVault P., CHAIBI W., SIMIER P., 2009. Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. *Plant. Physiol. Biochem.*, **47**: 153-159.

ABER M. et SALLE G., 1983. Graine et procaulôme d'*Orobanche crenata* Forsk. : étude histologique et cytochimique. *Can. J. Bot.*, **61**: 3302-3313.

ALY R., CHOLAKH H., JOEL D.M., LEIBMAN D., STEINITZ B., ZELCER A., NAGLIS A., YARDEN O., GAL-ON A., 2009. Gene silencing of mannose 6- phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnol. J.*, **7**: 487-498.

ALY R., PLAKHIN D., ACHDARI G., 2006. Expression of sarcotoxin IA gene via a root-specific tob promoter enhanced host resistance against parasitic weeds in tomato plants. *Plant Cell Rep.*, **25**: 297-303.

AUGER B., POUVREAU J.-B., POUPONNEAU K., YONEYAMA K., MONTIEL G., LE BIZEC B., YONEYAMA K., DELAVAUT P., DELOURME R., SIMIER P., 2012. Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Mol. Plant Microbe Interac.*, **25**: 993-1004.

AUGER B., POUVREAU J.B., MONTEAU F., GAUTHIER M., VAUTRIN S., BERGES H., DELAVAUT P., DELOURME R., SIMIER P., 2011. On the way to sustainable control of broomrape seed germination by root exudates of oilseed rape. In: *Abstract book of the 13th International Rapseed Congress*, Praha, Czech Republic.

AZIZ A., POINSSOT B., DAIRE X., ADRIAN M., BÉZIER A., LAMBERT B., JOUBERT J.-M., PUGIN A., 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant Microbe Interac.*, **16**: 1118-1128.

-B-

BAR-NUN N., MAYER A.M., 2002. Composition of and changes in storage compounds in *Orobanche aegyptiaca* seeds during preconditioning. *Isr. J. Plant Sci.*, **50**: 277-279.

BORGES A., COOLS H., LUCAS J., 2003. Menadione sodium bisulfite: a novel plant defense activator which enhances local and systemic resistance to infection by *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Plant Pathol.*, **52**: 429-436.

BUSCHMANN H., KÖMLE S., GONSIOR G., SAUERBORN J., 2005. Susceptibility of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*) to branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). *J. Plant Dis. Protect.*, **112**: 65-70.

-C-

CAO S., JIANG L., SONG S., JING R., XU G., 2006. *AtGRP7* is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in *Arabidopsis*. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **11**: 526-535.

CARDINALE F., JONAK C., LIGTERINK W., NIEHAUS K., BOLLER T., HIRT H., 2000. Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.*, **275**: 36734-36740.

CARROLL L., 1871. *Through the Looking-Glass, and What Alice Found There*. Henry Altemus, 1897, 209 pp.

CASTEJON-MUNOZ M., ROMERO-MUNOZ F., GARCIA-TORRES L., 1991. *Orobanche cernua* seed dispersal through sunflower achenes. *Helia*, **14**: 51-54.

CASTEJON-MUNOZ M., ROMERO-MUNOZ F., GARCIA-TORRES L., 1993. Effect of planting date on broomrape (*orobanche cernua* Loefl.) infections in sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Res.*, **33**: 171-176.

CASTILLEJO M.A., MALDONADO A.M., DUMAS-GAUDOT E., FERNANDEZ-APARICIO M., SUSIN R., RUBIALES D., JORRIN J., 2009. Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, **10**: 294.

COHAVI A., RUBIN B., EIZENBERG H., 2011. Developing a predictive model based on temperatures for *Phelipanche aegyptiaca* parasitism in carrots. In: *abstract book of the 11th world congress on parasitic plants*. Martina Franca, June 2011, Italy.

COÏC Y., LESAIN C., 1975. La nutrition minérale et en eau des plantes en horticulture avancée. *La documentation technique de la SCPA*, **23**: 1-22.

COOK C.E., WHICHARD L.P., WALL M.E., EGLEY G.H., COGGON P., LUHAN P.A., 1966. Germination of witchweed (*Striga lutea*): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, **154**: 1189-1190.

COSTE H., 1901-1906. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes, *Orobanche ramosa* subs *ramosa*.

CÔTÉ F., HAHN M., 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol. Biol.*, **26**: 1379-1411.

-D-

DE ZELICOURT A., LETOUSEY P., THOIRON S., CAMPION C., SIMONEAU P., ELMORJANI K., MARION D., SIMIER P., DELAVAUULT P., 2007. Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. *Planta*, **226**: 591-600.

DELAVALT P., SIMIER P., THOIRON S., VERONESI C., FER A., THALOUARN P., 2002. Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobanche ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiol. Plantarum*, **115**: 48-55.

DIE J.V., DITA M.A., KRAJINSKI F., GONZALEZ-VERDEJO C.I., RUBIALES D., MORENO M.T., ROMAN B., 2007. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Medicago truncatula* putative defence genes in response to *Orobanche crenata* parasitization. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **70**: 49-59.

DIE J.V., GONZALEZ VERDEJO C.I., DITA M.A., NADAL S., ROMAN B., 2009. Gene expression analysis of molecular mechanisms of defense induced in *Medicago truncatula* parasitized by *Orobanche crenata*. *Plant Physiol. Biochem.*, **47**: 635-641.

DONGO A., LEFLON M., SIMIER P., DELAVALT P., 2011. Development of a high throughput real-time quantitative PCR method to detect and quantify contaminating seeds of *Phelipanche ramosa* and *Orobanche cumana* in crop seed lots. *Weed Res.*, **52**: 34-41.

DÖRR I., 1997. How *Striga* parasitizes its host: a TEM and SEM study. *Ann. Bot.*, **79**: 463-472.

DÖRR I., KOLLMAN R., 1995. Symplasmic sieve element continuity between *Orobanche* and its host. *Bot. Acta*, **108**: 47-55.

DRAIE R., 2009. Effet du greffage sur la productivité de la tomate en condition de non infestation et d'infestation par l'orobanche. Caractérisation d'une invertase acide, enzyme majeure de la force de puits du parasite. *Thèse de doctorat*, Université de Nantes, Nantes.

DRAIE R., PÉRON T., POUVREAU J.-B., VÉRONÉSI C., JÉGOU S., DELAVALT P., THOIRON S., SIMIER P., 2011. Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSA11. *Mol. Plant Pathol.*, **12**: 638-652.

-E-

EBEL J., 1998. Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioassays* **20**: 569-576.

ECHEVARRIA-ZOMEÑO S., PEREZ-DE-LUQUE A., JORRIN J., MALDONADO A.M., 2006. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. *J. Exp. Bot.*, **57**: 4189-4200.

EIZENBERG H., COLQUHOUN J.B., MALLORY-SMITH C.A., 2004. The relationship between growing degree days and small broomrape (*Orobanche minor*) parasitism in red clover. *Weed Sci.*, **52**: 735-741.

EIZENBERG H., COLQUHOUN J.B., MALLORY-SMITH C.A., 2005. A predictive degree-days model for small broomrape (*Orobanche minor*) parasitism in red clover (*Trifolium pratense*) in Oregon. *Weed Sci.*, **53**: 37-40.

EJETA G., 2007. The *Striga* scourge in Africa: a growing problem, in Integrating New Technologies for *Striga* Control: Toward Ending the Witch-hunt, in: G. EJETA and J. GRESSEL (Eds), 2007, World Scientific Publishing Co: NJ, Hackensack, 356 p.

EL-HALMOUCH Y., BENHARRAT H., THALOUARN P., 2006. Effect of root exudates from different tomato genotypes on broomrape (*O. aegyptiaca*) seed germination and tubercle development. *Crop Prot.*, **25**: 501–507.

-F-

FER A., THALOUARN P., 1997. L'orobanche : une menace pour nos cultures. *Phytoma*, **499**: 34-40.

FERNÁNDEZ-APARICIO M., SILLERO J., RUBIALES D., 2009. Resistance to broomrape species (*Orobanche* spp.) in common vetch (*Vicia sativa* L.). *Crop prot.*, **28**: 7-12.

FERNANDEZ-MARTINEZ J. M., VELASCO L., PEREZ-VICH B., 2005. Resistance to new virulent *O. cumana* races. p. 27–28. p. 17–18. In: A. Murdoch (ed.), Abstract book COST849 Meeting on Broomrape Biology, Control and Management, Univ. Reading, Dept. Agri., UK, 15–17 Sept. 2005. <http://cost849.ba.cnr.it/Abstracts%20Reading%202005.pdf>.

FIRE A, XU S., MONTGOMERY M.K., KOSTAS S.A., DRIVER S.E., MELLO C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**: 806-811.

FLOR H.H., 1956. The complementary genetic systems in flax and flaxrust. *Advanc. Genet.*, **8**: 29-54.

FOY C.L., JAIN R., JACOBSON R., 1989. Recent approaches for chemical control of broomrape (*Orobanche* spp.). *Review of weed science*, **4**: 123-152.

FRISTENSKY B., BALCERZAK M., HE D., ZHANG P., 1999. Expressed sequence tags from the defense response of *Brassica napus* to *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant Pathology On-Line*, [<http://www.bspp.org.uk/mppol/1999/0301FRISTENSKY>].

-G-

GALLAIS A., et H. BANNEROT, 1992. Améliorations des espèces végétales cultivées, mieux comprendre, INRA éditions, Paris, 768 p.

GHERSA C.M., MARTINEZ-GHERSA M.A., 2000. Ecological of weed seed size and persistence in the soil under different tilling systems: implications for weed management. *Field Crops Res.*, **67**: 141–148.

GIBOT-LECLERC S., BRAULT M., PINOCHET X., SALLE G., 2003. Potential role of winter rape weeds in the extension of broomrape in Poitou-Charentes. *C. R. Biol.*, **326**: 645-658.

GIBOT-LECLERC S., CORBINEAU F., SALLE G., COME D., 2004. Responsiveness of *Orobanche ramosa* L. seeds to GR24 as related to temperature, oxygen availability and water potential during preconditionning and subsequent germination. *Plant Growth Regul.*, **43**: 63-71.

GIBOT-LECLERC S., TUQUET C., CORBINEAU F., ARJAURE G., SALLE G., 2001. New insights on *O. ramosa* L. parasitizing oilseed rape in western part of France. In: *Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium*, Nantes, France, p45.

GOLDWASSER Y., KLEIFELD Y., PLAKHINE D., RUBIN B., 1997. Variation in vetch (*Vicia* spp.) response to *Orobanche aegyptiaca*. *Weed Sci* **45**: 756–762.

GONSIOR G., BUSCHMANN H., SZINICZ G., OTMAR S., SAUERBORN J., 2004. Induced resistance – an innovative approach to manage branched broomrape (*Orobanche ramosa*) in hemp and tobacco. *Weed Sci.*, **52**: 1050-1053.

-H-

HABASHI, C. et D. JEANMONOD, 2008. *Orobanchaceae*, Compléments au Prodrôme de la Flore Corse. Ed. Conservatoire et Jardin Botaniques, Genève. 126 pp.

Haidar M.A., BIBI W., SIDAHMED M.M., 2003. Response of branched broomrape (*Orobanche ramosa*) growth and development to various soil amendments in potato. *Crop Prot.*, **22**: 291-294

HÁLA M., COLE R., SYNEK L., DRDOVÁ E., PECENKOVÁ T., NORDHEIM A., LAMKEMEYER T., MADLUNG J., HOCHHOLDINGER F., FOWLER J.E., ZÁRSKÝ V., 2008. An exocyst complex functions in plant cell growth in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, **20**: 1330-1345.

HAMAMOUCHE N., WESTWOOD J.H., BANNER I., CRAMER C.L., GEPSTEIN S., ALY R., 2005. A peptide from insects protects transgenic tobacco from a parasitic weed. *Transgenic Res.*, **14**: 227-236.

HAMMOND-KOSACK K.E., JONES J.D.G., 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**: 1773–1791.

HAUSSMANN B.I.G., HESS D.E., OMANYA G.O., REDDY B.V.S., WELZ H.G., GEIGER H.H., 2001. Major and minor genes for stimulation of *Striga hermonthica* seed germination in *sorghum*, and interaction with different *Striga* populations. *Crop Sci.*, **41**: 1507-1512.

HERMANN K.M., 1995. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell*, **7**: 907-919.

HIBBERD J.M., QUICK W.P., PRESS M.C., SCHOLES J.D., JESCHKE W.D., 1999. Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobanche cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant Cell Environ.*, **22**: 937-947.

HU X., ZHANG H., LI G., YANG Y., ZHENG Z., SONG F., 2009. Ectopic expression of a rice protein phosphatase 2C gene *OsBIPP2C2* in tobacco improves disease resistance. *Plant Cell Rep.*, **28**: 985-995.

HUANG K., MELLOR K.E., PAUL S.N., LAWSON M.J., MACKAY A.J., TIMKO M.P., 2012. Global changes in gene expression during compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with the root parasitic angiosperm *Striga gesnerioides*. *BMC genomics*, doi:10.1186/1471-2164-13-402.

-J-

INUI H., YAMAGUCHI Y., HIRANO S., 1997. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenyl-alanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**: 975-978.

-J-

JACOBSON R., BEN-GHEDALIA D., MARTON K., 1987. Effect of the animals digestive system on the infectivity of *Orobanche* seeds. *Weed Res.*, **27**: 87-90.

JIANG M., CAO J., 1998. Sequence variation of chalcone synthase gene in a spontaneous white-flower mutant of Chinese cabbage-pak-choi. *Mol. Biol. Rep.*, **4**: 507-512.

JOEL D.M., LOSNER-GOSHEN D., 1994. The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Can. J. Bot.*, **72**: 564-574.

JOEL D. M., KLEIFELD Y., LOSNER-GOSHEN D., HERZLINGER G., GRESSEL J.,1995. Transgenic crops against parasites. *Nature*, **374**: 49-50.

JOEL D.M., PORTNOY V.H., 1998. The angiospermous root parasite *Orobanche L.* (Orobanchaceae) induces expression of a pathogenesis related (PR) gene in susceptible tobacco roots. *Ann. Bot.*, **81**: 779-781.

JOEL D.M., HERSHENHORN J., EIZENBERG H., ALY R., EJETA G., RICH P.J., RANSOM J.K., SAUERBORN J., RUBIALES D., 2007. Biology and management of weedy root parasites. *Hort. Reviews*, **33**: 267-350.

JOEL D.M., CHAUDHURI S.K., PLAKHINE D., ZIADNA H., STEFFENS J.C., 2011a. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochem.*, **72**: 624-634.

JOEL D.M., BAR H., MAYER A.M., PLAKHINE D., ZIADNE H., WESTWOOD J.H., WELBAUM G.E., 2011b. Seed ultrastructure and water absorption pathway of the root-parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* (Orobanchaceae). *Ann. Bot.*, **109**: 181-195.

JOHNSON A.W., ROSEBERY G., PARKER C., 1976. A novel approach to *Striga* and *Orobanche* control using synthetic germination stimulants. *Weed Res.*, **16**: 223-227.

JORRIN J., SERGHINI K., PEREZ-DE-LUQUE A., MACIAS F.A., GARCIA-GALINDO J.C., GARCIA-TORRES L., CASTEJON-MUNOZ M., 1999. Plant resistance to parasitic angiosperms: a biochemical point of view. In: *Current Problems of Orobanche Research*, pp. 43–49. Eds K. Wegmann, L.J. Musselmann and D. Joel. Albena, Bulgaria: Institute for wheat and sunflower ‘Dobroudja’.

JOUBERT A., CALMES B., BERRUYER R., PIHET M., BOUCHARA J.-P., SIMONEAU P., GUILLEMETTE T., 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *Biotechniques*, **48**: 399-404.

-*K*-

KAPRANOV P., JENSEN T.J., POULSEN C., DE BRUIJN F.J., SZCZYGLOWSKI K., 1999. A protein 2C gene, *LjNPP2C1*, from *Lotus japonicus* induced during root nodule development. *PNAS*, **96**:1738- 1743.

KASASIAN L., 1971. *Orobanche* spp.. *PANS*, **17**: 35-41.

KEBREAB E., MURDOCH A.J., 1999. A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of *Orobanche* spp.. *J. Exp. Bot.*, **50**: 211-219.

KLARZYNSKY O., PLESSE B., JOUBERT J.-M., YVIN J.-C., KOPP M., KLOAREG B., FRITIG B., 2000. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense response in tobacco. *Plant Physiol.*, **124**: 1027-1037.

KLEIN O., J. KROSCHEL, J. SAUERBORN, 1999. Efficacité de lâchers périodiques de *Phytomyza orobanchia* Kalt. (Diptera: *Agromyzidae*) pour la lutte biologique contre l'Orobanche au Maroc. p. 161–171. In: J. Kroschel, H. Betz, and M. Abderahibi (eds.), *Advances in parasitic weed control at on-farm level*. Vol. II. Joint Action to control Orobanche in the WANA region. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany.

KNOT R.S., BHAT B.N., KADAPA S.N., KAMBAR N.S., 1987. Effect of deep tillage in summer on *Orobanche* incidence and yield of bidi tobacco. *Tobacco research*, **13**: 134-138.

KROSCHEL J., 2001. A Technical Manual for Parasitic Weed Research and Extension (ed. J KROSCHEL). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

KUIJT J., 1977. Haustoria of phanérogamie parasites. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **17**: 91-118.

KUSUMOTO D., GOLDWASSER Y., XIE X., YONEYAMA K., TAKEUCHI Y., YONEYAMA K., 2007. Resistance of red clover (*Trifolium pratense*) to the root parasitic plant *Orobanche minor* is activated by salicylate but not by jasmonate. *Ann. Bot.*, **100**: 537-544.

-ℒ-

LABROUSSE P., ARNAUD M.-C., SERIEYS H., BERVILLE A., THALOUARN P., 2001. Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr.. *Ann. Bot.*, **88**: 859-868.

LABROUSSE P., ARNAUD M.-C., GRIVEAU Y., FER A. THALOUARN P., 2004. Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against *Orobanche cumana* Wallr. *Crop Prot.*, **23**: 407-413.

LEBLANC A., RENAULT H., LECOURT J., ETIENNE P., DELEU C., LE DEUNFF E., 2008. Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine affect nitrate uptake and BnNrt2.1 and BnNrt1.1 transporter gene expression in oilseed rape. *Plant Physiol.*, **146**: 1928-1940.

LECHAT M.-M., POUVREAU J.-B., PERON T., GAUTHIER M., MONTIEL M., VERONESI C., TODOROKI Y., LE BIZEC B., MONTEAU F., MACHEREL D., DELAVAUPT P., 2012. *PrCYP707A1*, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *J. Exp. Bot.*, doi:10.1093/jxb/errs311839.

LEE Y.K., KIM G.T., KIM I.J., PARK J., KWAK S.S., CHOI G., CHUNG W.I., 2006. LONGIFOLIA1 and LONGIFOLIA2, two homologous genes, regulate longitudinal cell elongation in *Arabidopsis*. *Development* **133**: 4305-4314.

LEJEUNE A., CONSTANT S., DELAVAUPT P., SIMIER P., THALOUARN P., THOIRON S., 2009. Involvement of a putative *Lycopersicon esculentum* wall-associated kinase in the early steps of tomato-*Orobanche ramosa* interaction. *PMPP*, **69**: 3-12.

LEPOIVRE P., 2003. *Phytopathologie*, De Boeck Université, 427 pages.

LETOUSEY P., DE ZELICOURT A., VIEIRA DOS SANTOS C., THOIRON S., MONTEAU F., SIMIER P., THALOUARN P., DELAVAUPT P., 2007. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathol.*, **56**: 536-546.

LI J., TIMKO M.P., 2009. Gene-for-gene resistance in *Striga*-cowpea associations. *Science*, **325**: 1094.

LI R., RIMMER R., YU M., SHARPE A.G., SEGUIN-SWARTZ G., LYDIATE D., HEGEDUS D.D., 2003. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. *Planta*, **217**: 299-308.

LINKE K.H., SAUERBORN J., SAXENA M.C., 1989. *Orobanche* field guide. University of Hohenheim eds., 42pp.

LIU S., LIU R., LATUNDE-DADA A.O., COOLS H.J., FOSTER S.J., HUANG Y., FITT B.D., 2007. Comparison of *Leptosphaeria biglobosa*-induced and chemically induced systemic resistance to *L. maculans* in *Brassica napus*. *Chin. Sci. Bull.*, **52**: 1053-1062.

LOSNER-GOSHEN D., PORTNOY V.H., MAYER A.M., JOEL D.M., 1998. Pectolytic activity by the *haustorium* of the parasitic plant *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) in host roots. *Ann. Bot.*, **81**: 319-326.

LOZANO-BAENA M.D., MORENO M.T., RUBIALES D., PEREZ-DE-LUQUE A., 2007. *Medicago truncatula* as a model for non-host resistance in legume-parasitic plant interactions. *Plant Physiol.*, **145**: 437-449.

-M-

MABROUK Y., ZOURGUI L., SIFI B., DELAVAUPT P., SIMIER P., BELHADJ O., 2007a. Some compatible *Rhizobium leguminosarum* strains in peas decrease infections when parasitised by *Orobanche crenata*. *Weed Res.*, **47**: 44-53.

MABROUK Y., SIMIER P., ARFAOUI A., SIFI B., DELAVAUPT P., ZOURGUI L., BELHADJ O., 2007b. Induction of phenolic compounds in pea (*Pisum sativum* L.) inoculate by *Rhizobium leguminosarum* and infected with *Orobanche crenata*. *J. Phytopathol.*, **155**: 728-734.

MABROUK Y., MEJRI S., HEMISSI I., SIMIER P., DELAVAUPT P., SAIDI M., BELHADJ O., 2010. Bioprotection mechanisms of pea plant by *Rhizobium leguminosarum* against *Orobanche crenata*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **4**: 2570-2575.

MATUSOVA R., RANI K., VERSTAPPEN F.W.A., FRANSSSEN M.C.R, BEALE M.H., BOUWMEESTER H.J., 2005. The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway. *Plant Physiol.*, **139**: 920-934.

MAUROMICALE G., RESTUCCIA G., MARCHESE A., 2001. Soil solarization, a non-chemical technique for controlling *Orobanche crenata* and improving yield of faba bean. *Agronomie*, **21**: 757-765.

MÉNARD R., ALBAN S., DE RUFFRAY P., JAMOIS F., FRANZ G., FRITIG B., YVIN J.-C., KAUFFMANN S., 2004. β -1,3 glucan sulphate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signalling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**: 3020-3032.

MÉNARD R., ALBAN S., DE RUFFRAY P., FRITIG B., YVIN J.-C., KAUFFMANN S., 2005. Defense and resistance-inducing activities in tobacco of the sulfated β -1,3 glucan PS3 and its synergistic activities with the unsulfated molecule. *Plant Cell Physiol.*, **46**: 1964-1972.

MESA-GARCIA J., GIRALDEZ J.V., GARCIA-TORRES L., 1986. A study of the population dynamics and dispersal of crenata broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in a broadbean (*Vicia faba* L.) field. In: *Proceedings of the Workshop on Biology and Control of Orobanche*, Wageningen, The Netherlands, p114-117.

MOFFATT B.A., WANG L., ALLEN M.S., STEVENS Y.Y., QIN W., SNIDER J., VON SCHWARTZENBERG K., (2000). Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol.*, **124**: 1775-1785.

MOFFATT B.A., STEVENS Y.Y., ALLEN M.S., SNIDER J.D., PEREIRA L.A., TODOROVA M.I., SUMMERS P.S., WERETILNYK E.A., MARTIN-MCCAFFREY L., WAGNER C., 2002. Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol.*, **128**: 812-821.

MOLINERO-RUIZ M.L., MELERO-VARA J.M., 2005. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) populations overcoming the *Or5* gene. p. 165–169. In G. J. Seiler (ed.), In: *Proceedings of the 16th International Sunflower Conference*, Fargo, ND, Int. Sunflower Assoc., Paris.

MOLINERO-RUIZ M.L., GARCIA-RUIZ R., MELERO-VARA J.M., DOMINGUEZ J., 2009. *Orobanche cumana* race F: performance of resistant sunflower hybrids and aggressiveness of populations of the parasitic weed. *Weed Res.*, **49**: 469-478.

MUSSELMANN L.J., 1980. The biology of *Striga*, *Orobanche*, and other root-parasitic weeds. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **18**: 463-489.

MUSSELMANN L.J., M.C. PRESS, 1995. Introduction to parasitic plants, In: M.C. PRESS and J.D. GRAVES (Eds.), *Parasitic plants*, CHAPMAN & HALL, London, 292 p.

-N-

NAPOLI C., LEMIEUX C., JORGENSEN R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**: 279-289.

NAUR P., HANSEN C.H., BAK S., HANSEN B.G., JENSEN N.B., NIELSEN H.L., HALKIER B.A., 2003. CYP79B1 from *Sinapis alba* converts tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Arch. Biochem. Biophys.*, **409**: 235–241.

NEWMAN M.A., CONRADS-STRAUCH J., SCOFIELD G., DANIELS M.J., DOW J.M., 1994. Defense-related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interac.*, **7**: 553-563.

NI Y., JIANG H.-L., LEI B., LI J.-N., CHAI Y.-R., 2008. Molecular cloning, characterization and expression of two rapeseed (*Brassica napus* L.) cDNAs orthologous to *Arabidopsis thaliana* phenylalanine ammonia-lyase 1. *Euphytica* **159**: 1-16

NICHOLSON R.L., HAMMERSCHMIDT R., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **30**: 369-389.

-O-

OKAMOTO M, KUWAHARA A, SEO M, KUSHIRO T, ASAMI T, HIRAI N, KAMIYA Y, KOSHIBA T, NAMBARA E. 2006. CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **141**: 97-107.

-P-

PARKER C. et C.R. RICHES, 1993. Parasitic Weeds of the World: Biology and Control, Wallingford: CAB International, 332 p.

PARKER C., 2009. Observations on the current status of *Orobanch*e and *Striga* problems worldwide. *Pest. Manag. Sci.*, **65**: 453-459.

PARKUNAN V., JOHNSON C., EISENBACK J., 2011. Influence of acibenzolar-S-methyl and mixture of *Bacillus* species on growth and vigor of cultivated tobacco. *Tob. Science* **48**: 7-14.

PASQUER F., ISIDORE E., ZARN J., KELLER B., 2005. Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. *Plant. Mol. Biol.*, **57**: 693-707.

PEREZ-DE-LUQUE A., JORRIN J.V., RUBIALES D., 2004. Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica.*, **32**: 21-29.

PEREZ-DE-LUQUE A., JORRIN J., CUBERO J.I., RUBIALES D., 2005a. Resistance and avoidance against *Orobanch*e *crenata* in pea (*Pisum* spp.) operate at different developmental stages of the parasite. *Weed Res.*, **45**: 379-387.

PEREZ-DE-LUQUE A., RUBIALES D., CUBERO J.I., PRESS M.C., SCHOLES J., YONEYAMA K., TAKEUCHI Y., PLAKHINE D., JOEL D.M. 2005b. Interaction between *Orobanch*e *crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite. *Ann. Bot.*, **95**: 935-942.

PEREZ-DE-LUQUE A., LOZANO M.D., CUBERO J.I., GONZALEZ-MELENDI P., RISUEÑO M.C., RUBIALES D., 2006. Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanch*e *crenata* and *Vicia sativa*. *J. Exp. Bot.*, **57**: 931-942.

PEREZ-DE-LUQUE A., MORENO M.T. RUBIALES D., 2008. Host plant resistance against broomrapes (*Orobanch*e spp.): defence reactions and mechanisms of resistance. *Ann. Appl. Biol.*, **152**: 131-141.

PERON T., 2010. Caractérisation moléculaire et régulation de la force de puits de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel vis-à-vis du saccharose prélevé chez son hôte. Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes.

PIETERSE A.H., 1979. The broomrapes (*Orobanchaceae*) – a review. *Abstract on Tropical Agriculture*, **5**: 9-35.

PLAZA L., FERNANDEZ I., JUAN R., PASTOR J., PUJADAS A., 2004. Micromorphological studies on seeds of *Orobanche* species from the iberian peninsula and the balearic islands, and their systematic significance. *Ann. Bot.*, **94**: 167-178.

POTLAKAYALA S.D., REED D.W., COVELLO P.S., FOBERT P.R., 2007. Systemic acquired resistance in canola is linked with pathogenesis-related gene expression and requires salicylic Acid. *Phytopathol.*, **97**: 794-802.

-*R*-

RADOMILJAC A.M., MCCOMB J.A., MCGRATH J.F., 1999. Intermediate host influences on the hemi-parasite *Santalum album* L. biomass and partitioning. *Forest. Ecol. Manag.*, **113**: 143-153.

RASK L., ANDREASSON E., EKBOM B., ERIKSSON S., PONTOPPIDAN B., MEIJER J., 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.*, **42**: 93-113.

RAYNAL-ROQUES A., PARE J., 1998. Biodiversité des Phanérogames parasites : leur place dans la classification systématique. *Adansonia*, **20** : 313-322.

RENARD-MERLIER D., RANDOUX B., NOWAK E., FARCY F., DURAND R., REIGNAULT P., 2007. Iodur 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry*, **56**: 1156-1164.

RIOPEL J.L., TIMKO M.P., 1995. Haustorial initiation and differentiation. p. 39-79. In: M. C. Press and J. D. Graves (eds.), *Parasitic plants*. Chapman & Hall, London.

ROMAN B., SATOVIC Z., RUBIALES D., TORRES A.M., CUBERO J.I., KATZIR N., JOEL D.M., 2002a. Variation Among and Within Populations of the Parasitic Weed *Orobanche crenata* from Spain and Israel Revealed by Inter Simple Sequence Repeat Markers. *Phytopathology*, **92**: 1262-1266.

ROMAN B., TORRES A.M., RUBIALES D., CUBERO J.I., SATOVIC Z., 2002b. Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome*, **45**: 1057–1063.

RUBIALES D., 2003a. Parasitic plants, wild relatives and the nature of resistance. *New Phytol.*, **160**: 459–461.

RUBIALES D., PEREZ-DE-LUQUE A., CUBERO J.I., SILLERO J.C., 2003b. Crenate broomrape (*Orobanche crenata*) infection in field pea cultivars. *Crop Prot.*, **22**: 865-872.

RUBIALES D., ALCÁNTARA C., PÉREZ-DE-LUQUE A., SILLERO J.C., 2003c. Characterization of resistance in chickpea to crenate broomrape (*Orobanche crenata*). *Weed Sci.*, **51**: 702-707.

RUBIALES D., FERNANDEZ-APARICIO M., 2011. Innovations in parasitic weeds management in legume crops. *A review. Agron. Sustain. Dev.*, **32**: 433-449.

-S-

SACHETTO-MARTINS G., FRANCO L.O., DE OLIVEIRA D.E., 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**: 1-14.

SAUERBORN J., LINKE K.H., SAXENA M.C., KOCH W. 1989a. Solarization, a physical control method for weeds and parasitic plants (*Orobanche* spp.) in Mediterranean agriculture. *Weed Res.*, **29**: 391-393.

SAUERBORN J., BUSCHMANN H., GHIASVAND GHIASI K., KOGEL K.H., 2002. Benzothiadiazole activates resistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root-parasitic weed *Orobanche cumana*. *Phytopathol.*, **92**: 59-64.

SCHNEEWEISS G.M., COLWELL A., PARK J.M., JANG C.G., STUESSY T.F., 2004. Phylogeny of holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from nuclear ITS sequences. *Mol. Phylogen. Evol.*, **30**: 465-478.

SCHWEIGHOFER A., HIRT H., MESKIENE I., 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.*, **9**: 236-243.

SCHWEIGHOFER A., KAZANAVICIUTE V., SCHEIKL E., TEIGE M., DOCZI R., HIRT H., SCHWANNINGER M., KANT M., SCHUURINK R., MAUCH F., BUCHALA A., CARDINALE F., MESKIENE I., 2007. The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**: 2213-2224.

SEEL W.E., JESCHKE W.D., 1999. Simultaneous collection of xylem sap from *Rhinanthus minor* and the hosts *Hordeum* and *Trifolium*: hydraulic properties, xylem sap composition and effects of attachment. *New Phytol.*, **143**: 281-298.

SERGHINI K., PEREZ-DE-LUQUE A., CASTEJON-MUNOZ M., GARCIA TORRES L., JORRIN J.V., 2001. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: Induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarin. *J. Exp. Bot.*, **52**: 2227-2234.

SHIBUYA N., MINAMI E., 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Path.*, **59**: 223-233.

SHIMONO M., SUGANO S., NAKAYAMA A., JIANG C.J., ONO K., TOKI S., TAKATSUJI H., 2007. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell*, **19**: 2064-2076.

SHINDROVA. P AND KOSTOV A., 2009. Broomrape as a future problem for oilseed rape production in Bulgaria. In: *Proceedings of the 10th World Congress on Parasitic Plants*, Kusadasi, Turkey, p61.

SILLERO J.C., CUBERO J.I., FERNANDEZ-APARICIO M., RUBIALES D., 2005a. Search for resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in *Lathyrus*. *Lathyrism Newsletters*, **4**: 7-11.

SILLERO J.C., MORENO M.T., RUBIALES D., 2005b. Sources of resistance to crenate broomrape among species of *Vicia*. *Plant Dis.*, **89**: 23-27.

SIMIER P., RENAUDIN S., FER A., 1994. Characteristics of the mannitol pathway in a root hemiparasitic species, *Thesium humile* Vahl (*Santalaceae*). *J. Plant Physiol.*, **143**: 33-38.

SINGH M., SINGH D.V., MISRA P.C., TEWARI K.K., KRISHNAN P.S., 1968. Biochemical aspects of parasitism by angiosperm parasites: starch accumulation. *Physiol. Plantarum*, **21**: 525-538.

SMITH D.C. and A.E. DOUGLAS, 1987. *The biology of symbiosis*, Edward Arnold, London.

SOBRINO-VESPERINAS E., 1982. *Orobanche ramosa* L., a new rapeseed parasite in southern Spain. *Cruciferae Newsletter*, **7**: 76-77.

SOBRINO VESPERINAS E., 1985. Search for resistance to *Orobanche ramosa* L. in rapeseed. *Cruciferae newsletter*, **10**: 120-121.

SONG W.J., ZHOU W.J., JIN Z.L., CAO D.D., JOEL D.M., TAKEUCHI Y., YONEYAMA K., 2005. Germination response of *Orobanche* seeds subjected to conditioning temperature, water potential and growth regulator treatments. *Weed Res.*, **45**: 467-476.

STRÜH C.M., JÄGER S., SCHEMPP C.M., SCHEFFLER A., MARTIN S.F., 2012. A novel triterpene extract from mistletoe induces rapid apoptosis in murine B16.F10 melanoma cells. *Phytother. Res.*, DOI: 10.1002/ptr.4604.

-*T*-

TAN S., EVANS R.R., DAHMER M.L., SINGH B.K., SHANER D.L., 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest. Manag. Sci.*, **61**: 246-257.

TERP N., GÖBEL C., BRANDT A., FEUSSNER I., 2006. Lipoxygenases during *Brassica napus* seed germination. *Phytochem.* **67**: 2030-2040.

THOMAS H., HELLER A., SAUERBORN J., MULLER-STOVER D., 1999. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Orthoceras*, a potential mycoherbicide, parasitizes seeds of *Orobancha cumana* (sunflower broomrape): a cytological study. *Ann. Bot.*, **83**: 453-458.

TOMILOV A.A., TOMILOVA N.B., WROBLEWSKI T., MICHELMORE R., YODER J.I., 2008. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *Plant J.*, **56**: 389-397.

TSIALTAS J.T., ELEFTHEROHORINOS I.G., 2011. First Report of Branched Broomrape (*Orobancha ramosa*) on Oilseed Rape (*Brassica napus*), Wild Mustard (*Sinapis arvensis*), and Wild Vetch (*Vicia* spp.) in Northern Greece. *Plant Dis.*, **95**: 1322.

-*U*-

U N., 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. *Japan. J. Bot.*, **7**: 389-452.

-*V*-

VAN VALEN L., 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, **1**: 1-30.

VERCAUTEREN I., DE ALMEIDA ENGLER J., DE GROODT R., GHEYSEN G., 2002. An *Arabidopsis thaliana* pectin acetyltransferase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol. Plant Microbe Interac.* **15**: 404-407.

VERONESI C., BENHARRAT H., DELAVAUT P., SIMIER P., 2006. Oilseed rape broomrape, a comparative study of susceptible and resistant oilseed rape varieties against this parasite and characterization of defense biochemical markers. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, **599**: 45-47.

VERONESI C., BONNIN E., BENHARRAT H., FER A., THALOUARN P., 2005. Are pectinolytic activities of *Orobanche cumana* seedlings related to virulence towards sunflower? *Isr. J. Plant Sci.*, **53**: 19-27.

VERONESI C., BONNIN E., CALVEZ S., THALOUARN P., SIMIER P., 2007. Activity of secreted cell wall-modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobanche ramosa*. *Biol. Plantarum*, **51**: 391-394.

VERONESI C., DELAVAUT P., SIMIER P., 2009. Acibenzolar-S-methyl induces resistance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) against branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). *Crop Prot.*, **28**: 104-108.

VIEIRA DOS SANTOS C., LETOUSEY P., DELAVAUT P., THALOUARN P., 2003a. Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology*, **93**: 451-457.

VIEIRA DOS SANTOS C., DELAVAUT P., LETOUSEY P., THALOUARN P., 2003b. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobanche ramosa* infestation. *Physiol. Mol. Plant. Path.*, **62**: 297-303.

VIRTUE J.G., DEDEAR C., POTTER M.J., RIEGER M., 2006. Potential use of isothiocyanates in branched broomrape eradication. In: *Proceedings of the 15th Australian Weeds Conference*, Adelaide, Australia, 629-632.

VOISIN M., DUFFÉ P., PÉREZ E., HADJOU F., DELAVAUT P., DELOURME R., SIMIER P., 2011. Host specificity and genetic diversity of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* on winter oilseed rape in France. In: *Abstract book of the 13th International Rapeseed Congress*, Praha, Czech Republic.

VRANCEANU A.V., TUDOR V.A., STOENESCU F.M., PARVU N., 1980. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., differential hosts and resistance sources and genes in sunflower. In: *Proceedings of the 9th International Sunflower Conference*, Torremolinos, Spain. Int. Sunflower Assoc., Paris **1**: 74-82.

VUYLSTEKE M., PELEMAN J.D., VAN EIJK J.T., 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat. Protoc.*, **2**: 1399-1413.

-W-

WARREN P., 2005. The Branched Broomrape Eradication Project in Australia. In: D. M. JOEL, D. RUBIALES, J. VERKLEIJ, AND A. MURDOCH (Eds.), Proc. COST 849 *Workshop: Means for Limiting Orobanche Propagation and Dispersal in Agricultural Fields*. Newe-Ya'ar, Israel.

WESTON B., WHITT S., BENTON C., CARLSON D., MORE D., MANKIN L., 2011. Development of CLB-1: a novel single gene herbicide tolerance trait in oilseed rape conferring imidazolinone tolerance and ease of breeding. In: *Abstract book of the 13th International Rapeseed Congress*, Praha, Czech Republic, p50.

WESTWOOD J.H., 2000. Characterization of the *Orobanche-Arabidopsis* system for studying parasite-host interactions. *Weed Sci.*, **48**: 742-748.

WIGCHERT S.C., KUIPER E., BOELHOUWER G.J., NEFKENS G.H., VERKLEIJ J.A., ZWANENBURG B., 1999. Dose-response of seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche* toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *J. Agric. Food. Chem.*, **47**: 1705-1710.

-Y-

YONEYAMA K., TAKEUCHI Y., YOKOTA T., 2001. Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover root requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. *Physiol. Plant.*, **112**: 25-30.

YONEYAMA K., AWAD A.A., XIE X., YONEYAMA K., TAKEUCHI Y., 2010. Strigolactones as Germination Stimulants for Root Parasitic Plants. *Plant Cell Physiol.*, **51**: 1095-1103

-Z-

ZEHAR N., LABROUSSE P., ARNAUD M.-C., BOULET C., BOUYA D., FER A., 2003. Study of resistance to *Orobanche ramosa* in host (oilseed rape and carrot) and non-host (maize) plants. *Eur. J. Plant. Pathol.*, **109**: 75-82.

Liste des illustrations

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Relations entre les espèces importantes de <i>Brassica</i>	9
Figure 2 : Débouchés de la filière colza	11
Figure 3 : Composition de la graine de colza et du tourteau	11
Figure 4 : Répartition de la culture du colza en France	15
Figure 5 : Evolution de la production des 3 principales cultures oléagineuses en France	15
Figure 6 : Evolution de l'activité de trituration	17
Figure 7 : Evolution des surfaces de graines oléagineuses dans l'UE	17
Figure 8 : Evolution de la production de graines oléagineuses dans l'UE	19
Figure 9 : Différents types de parasitisme chez les plantes	21
Figure 10 : Exemple de plantes parasites les plus connues	23
Figure 11 : Dessin de <i>Phelipanche ramosa</i> ; Photographie de <i>Phelipanche ramosa</i> sur colza	27
Figure 12 : Morphologie externe des graines de différentes espèces d'orobanches	27
Figure 13 : Coupe longitudinale d'une graine sèche de <i>Phelipanche aegyptiaca</i>	29
Figure 14 : Formule développée des molécules inductrices de la germination des graines d'orobanche	29
Figure 15 : Cycle de développement de <i>Phelipanche ramosa</i> calqué sur le cycle de développement de son hôte le colza	31
Figure 16 : Carte de répartition des secteurs infestés par <i>Phelipanche ramosa</i> sur colza	36
Figure 17 : Effet des exsudats racinaires de pois sur la germination <i>in vitro</i> de Graines d' <i>Orobanche crenata</i>	45
Figure 18 : Modification des activités PPO et peroxydase dans les racines de pois / modification de la teneur en composés phénoliques totaux et en lignine des racines de pois	47

Figure 19 : Mécanismes de résistance durant la fixation	51
Figure 20 : Mécanismes de résistance au parasite fixé	53
Figure 21 : Activité du peptide Ha-Def1 sur les germinations d' <i>O. cumana</i> et de <i>Phelipanche ramosa</i>	55
Figure 22 : Schéma et photographie du montage en hydroponie	66
Figure 23 : Stades de développement de <i>P. ramosa</i> au cours de son cycle de vie	68
Figure 24 : Expérience de criblage en serre des génotypes de colza vis-à-vis de l'orobanche	70
Figure 25 : Cinétique du taux de germination lors de l'interaction <i>B. napus</i> – <i>P. ramosa</i> obtenue lors des expérimentations en hydroponie	72
Figure 26 : Taux de germination des graines de <i>P. ramosa</i> et nombre de tubercules fixés / gramme de matière sèche de racine obtenus dans les expérimentations hydroponiques pour 10 génotypes de colza	72
Figure 27 : Nombre de tubercules de <i>P. ramosa</i> fixés sur quatre génotypes de colza par gramme de matière sèche en condition hydroponique	75
Figure 28 : Cinétique du développement des tubercules de <i>P. ramosa</i> en stade 4 pour les 10 génotypes de colza testés	79
Figure 29 : Différences morphologiques entre les tubercules de <i>P. ramosa</i> fixés sur le génotype Grizzly et Shakira	79
Figure 30 : Schéma récapitulatif des étapes de la technique cDNA-AFLP	94
Figure 31 : Profil cDNA-AFLP type obtenu après migration sur gel de polyacrylamide des produits de PCR des fragments de restrictions des enzymes BstYI et MseI	101
Figure 32 : Profil d'expressions des gènes marqueurs de différentes voies de défenses	107
Figure 33 : Expression du gène marqueur PR-1 en PCR semi quantitative suivant un traitement BTH au niveau des feuilles	107
Figure 34 : Etude de l'expression de PR-1 dans des feuilles et dans les racines de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> traitées au niveau des feuilles	109
Figure 35 : Effet d'un traitement BTH sur les racines de colza et incidence sur le nombre de fixations de <i>P. ramosa</i>	109
Figure 36 : Etude de l'expression de PR-1 et PR-2 en qRT-PCR dans des racines de colza traitées par du BTH (sans Tween 20) ou à l'eau au niveau des racines	111

Figure 37 : Effet d'un traitement à la laminarine sur la biomasse des plants de colza infestés par l'orobanche rameuse	116
Figure 38 : Effet d'un traitement à la laminarine sur l'orobanche rameuse infestant le système racinaire de plants de colza	118
Figure 39 : Constatation de Van Valen sur l'évolution et l'extinction des espèces imagée par une scène de « de l'autre côté du miroir » de Lewis Carroll	126
Figure 40 : Mécanismes de résistance mis en évidence chez le colza infesté par <i>P. ramosa</i>	130

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales applications des usages non alimentaires des huiles végétales Européennes	13
Tableau II : Familles et espèces de plantes parasites chez les phanérogames	21
Tableau III : Principales espèces d'orobanches pathogènes de cultures d'intérêts et leurs hôtes	25
Tableau IV : géotypes de colzas testés et fournisseurs	64
Tableau V : Composition du milieu de culture Coic 50 %	66
Tableau VI : Cinétiques de développement des tubercules de <i>P. ramosa</i> sur colza en expérimentation en co-cultures hydroponiques	77
Tableau VII : Liste des amorces utilisées pour les PCR semi-quantitatives et qRT-PCR	99
Tableau VIII : Transcrits présentant une expression différentielle dans l'analyse du cDNA-AFLP	103
Tableau IX : Effet de la laminarine sur le taux de germination des graines d'orobanches	118

Liste des abréviations

% : pourcent

‰ : pour mille

°C : Degré Celsius

2-PEITC : 2-phenylethyl isothiocyanate

³³P : isotope radioactif du Phosphore 31 (³¹P)

a.i. : active ingredient (matière active)

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFLP : Amplification Frame Length Polymorphism

AMSOL : Association des industries des semences de plantes oléagineuses

ANOVA : Analyse Of VAriance

ARN : Acide ribonucléique

ASM : acibenzolar-S-methyl

ATP : Adénosine-5'-TriPhosphate

BTH : Benzothiadiazole = benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid (S) methylester

CETIOM : Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux métropolitains

cm : centimètre

DTT : DiThioThréitol

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

ET : Ethylène

g : gramme

h : heure

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ITC : Isothiocyanate

ITS : Internal Transcribed Spacer

JA : Jasmonic Acid (acide jasmonique)

jai : jours après infestation

L ou l : Litre

LAR : Localized Acquired Resistance (résistance locale acquise)

LBPV : laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales

m : milli

M : Molaire

m² : mètre carré

MALDI-TOF/TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight

MAS : Marker Assisted Selection (sélection assistée par marqueurs)

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique à Transmission

min : minute

mol : mole
MS : Matière Sèche
Ø : Diamètre
P : Probabilité
PAC : Politique Agricole Commune
PAR : Photosynthetic Active Radiation (radiation photosynthétiquement active)
PCR : Polymerase Chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PME : Pectine-Méthyl-Estérase
q-RT-PCR : quantitative-Real Time-PCR
QTL : Quantitative Trait Loci
Rpm : rotation par minute
RT-(PCR) : Reverse Transcription
SA : Salycilic Acid (acide salicylique)
SAR : Systemic Acquired Resistance (résistance systémique acquise)
SDN : Stimulateur des Défenses Naturelles
sec : seconde
TBE : Tris-Boric acid-EDTA
U : Unité
UE : Union Européenne
USDA : U.S. Department of Agriculture
vol : volume
w/v : rapport poids/volume
α : risque alpha
μ : microlitre

Etude et caractérisation des mécanismes de résistance de *Brassica napus* (colza, *brassicaceae*) vis-à-vis de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (*Orobanchaceae*).

Depuis une quinzaine d'années, la plante parasite, *Phelipanche ramosa*, est en pleine expansion dans les champs de colza d'hiver en France. Plusieurs génotypes de colza ont montré au champ des comportements contrastés vis-à-vis de ce pathogène, suggérant qu'une variabilité génétique était disponible pour des programmes de sélection. Dix génotypes sélectionnés pour leur réponse contrastée ont été analysés en co-cultures hydroponiques et en serres afin de déterminer les composantes de cette résistance. Si aucune résistance totale n'a pu être identifiée, des caractères de résistance partielle ont été mis en évidence : un faible taux d'induction de la germination des graines du parasite par les racines de l'hôte, une limitation du nombre de tubercules fixés sur le système racinaire, et le déclenchement d'un retard de développement, voire une perturbation de la croissance des orobanches fixées, minimisant et retardant l'émergence du sol du parasite.

La possible induction de mécanismes de résistance du colza par un SDN (BTH) a aussi été étudiée afin de mettre en évidence des voies de défense induites dans les racines, suite à un traitement foliaire. La cDNA-AFLP réalisée a révélé que le signal BTH appliqué sur les feuilles n'induit pas de réponse transcriptomique dans les racines de colza. En revanche, par application directe sur les racines, le BTH induit l'expression de PR-1, un gène marqueur de la voie signalisation du SA, et provoque une diminution du nombre de fixations d'orobanche. De même, un autre SDN, la laminarine extraite de l'algue *Laminaria digitata*, induit une diminution du nombre de fixations d'orobanche suite à un traitement du sol mais pas par pulvérisation foliaire.

Interaction plante - plante parasite, *Brassica napus*, *Phelipanche ramosa*, mécanismes de résistance, SDN.

Characterization of *Brassica napus* (oilseed rape, *Brassicaceae*) defence mechanisms toward the parasitic plant *Phelipanche ramosa* (L.) pomel (*Orobanchaceae*) infection.

Over the past decade, *Phelipanche ramosa*, a weedy parasitic plant (broomrape), has been increasingly infesting winter oilseed rape fields in France. Elite lines have shown different responses in *P. ramosa* infested fields, suggesting that genetic variability might be available for breeding programmes. Ten WOSR genotypes selected for their contrasting response in field experiments were analysed using hydroponic and greenhouse co-culture experiments to determine the components of resistance. While no total resistance was identified, some partial resistance mechanisms were observed : a low induction of *P. ramosa* seed germination by host roots, a limitation of parasite attachments on root systems, and the induction of a delayed or even disturbed growth of tubercles, minimising and delaying parasite emergence from the soil.

The possible induction of resistance mechanisms in oilseed rape by BTH, an elicitor of natural plant defences, was also studied in order to identify defence pathways induced in roots upon leaf treatment. The cDNA-AFLP experiment revealed that BTH signal applied on leaves did not induce a transcriptomic response in oilseed rape roots. However, BTH, directly applied on roots, induced the expression of PR1, a gene marker of the SA signalling pathway, and prevented *P. ramosa* attachments. Similarly, another elicitor compound, the laminarin extracted from the algae *Laminaria digitata*, induced a reduction of broomrape attachments when applied by soil drench but not by leaf spray.

Parasitic plant - plant interaction, *Brassica napus*, *Phelipanche ramosa*, resistance mechanisms, Natural Defence elicitors.