

THESE  
pour le  
DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Hélène PACAUD

*Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2004*

LES ANGIOSPERMES PARASITES :  
PARTICULARITE DE LA  
MANNOSE 6-PHOSPHATE REDUCTASE CHEZ  
L'HEMIPARASITE *STRIGA HERMONTHICA*

Président : M. Christos ROUSSAKIS, MCU de Pharmacognosie

Membres du Jury : Mme Claire SALLENAVE - NAMONT, MCU de Cryptogamie,  
Botanique et Biotechnologies  
M. Philippe SIMIER, MCU de Physiologie Végétale  
M. Eric GUILBERT, Pharmacien

## REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur P. THALOUARN et Monsieur le Professeur A. FER. Vous m'avez accueillie au sein du Groupe de Physiologie et de Pathologie Végétales. Soyez remerciés de la confiance que vous m'avez témoignée.

A Monsieur P. SIMIER. J'ai apprécié vos compétences techniques, scientifiques et pédagogiques au cours de mon stage, ainsi que votre grande disponibilité, notamment au cours de la rédaction du mémoire de DEA et de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon respect et de ma gratitude.

A Madame C. SALLENAVE-NAMONT. Vous avez accepté de juger mon travail et votre aide lors de la rédaction de cette thèse m'a été précieuse. Soyez assurée de mes remerciements les plus sincères.

A Messieurs C. ROUSSAKIS et E. GUILBERT. Soyez remerciés de l'attention que vous m'avez portée en acceptant d'être membres de mon Jury de thèse.

A Mesdames Colette LARRE et Hélène ROGNIAUX. Vos compétences en spectrométrie de masse ont participé à l'avancée de ce travail. Merci pour votre collaboration.

A Monsieur P. DELAVault. Vos explications et vos conseils en biologie moléculaire m'ont été d'une grande utilité. Soyez-en remercié.

A Patricia et Alexandre, Raphaël et Rudy. Votre enthousiasme et votre gentillesse ont largement contribué au bon déroulement de mon stage. Recevez ici le témoignage de toute ma sympathie.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b><i>A. thaliana</i></b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>APS</b>	Ammonium persulfate
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>CAD</b>	Cinnamyl alcool déshydrogénase
<b>DPP</b>	Diphényl phosphate
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>ECL</b>	Electrochimiluminescence
<b>G3P DH</b>	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
<b>gel 1D</b>	Gel d'électrophorèse monodimensionnelle
<b>H + L</b>	Heavy + light
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice 50
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante d'inhibition
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LB</b>	Milieu de Luria Bertani
<b>LC-MS/MS</b>	Liquid chromatography mass spectrometry / mass spectrometry
<b>M1P</b>	Mannitol 1-phosphate
<b>M6P</b>	Mannose 6-phosphate
<b>M6PR</b>	Mannose 6-phosphate réductase
<b>MDH</b>	Malate déshydrogénase
<b>MF</b>	Matière fraîche
<b>MT</b>	Marqueur de taille
<b>NADP(H)</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
<b><i>O. ramosa</i></b>	<i>Orobancha ramosa</i>
<b>ORF</b>	Open reading frame

<b>p/v</b>	poids/volume
<b>PAR</b>	Photosynthetically Active Radiation
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>PM</b>	Poids moléculaire
<b>PVPP</b>	polyvinylpolypyrrolidone
<b>Qox</b>	Quinone oxydoréductase
<b>RACE</b>	Rapid amplification of cDNA end
<b>RY 86</b>	Reactive yellow 86
<b><i>S. hermonthica</i></b>	<i>Striga hermonthica</i>
<b>SDS PAGE</b>	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SPS</b>	Saccharose phosphate synthase
<b>TBS</b>	Tris buffer salin
<b>TBST</b>	Tris buffer salin tween
<b>Tm</b>	Melting temperature
<b>TP</b>	Trioses phosphates
<b>v/v</b>	volume/volume
<b>var.</b>	variété

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
BIBLIOGRAPHIE .....	2
I - Généralités sur les Angiospermes parasites	
A - <u>Classification</u>	
1 - Selon la capacité photosynthétique : hémiparasitisme et holoparasitisme.....	3
2 - Selon le site d'attachement à l'hôte.....	5
B - <u>Particularité parasitaire : l'<i>haustorium</i></u>	
C - <u>Conséquences économiques du parasitisme</u> .....	6
II - Modèle d'étude : <i>Striga hermonthica</i> ( <i>Scrophulariaceae</i> ).....	7
A - <u>Les Scrophulariacées parasites - Le genre <i>Striga</i></u>	
1- Taxonomie	
2 - Répartition géographique - Plantes hôtes - Impact économique	
B - <u>Modèle d'étude : <i>Striga hermonthica</i></u> .....	9
1 - Classification - Plantes hôtes	
2 - Description.....	10
a - <i>Partie aérienne</i>	
b - <i>Partie souterraine</i> .....	11
3 - Cycle de développement.....	12
a - <i>Dormance</i>	
b - <i>Conditionnement</i> .....	13
c - <i>Germination</i>	
d - <i>Fixation à la racine hôte et formation du suçoir primaire</i> .....	14
e - <i>Développement de l'appareil végétatif, floraison et fructification</i>	
4 - Capacité photosynthétique de <i>S. hermonthica</i>	
5 - Relations trophiques entre <i>S. hermonthica</i> et son hôte.....	15
a - <i>Approvisionnement hydrominéral</i>	
b - <i>Alimentation carbonée</i>	

c - Alimentation azotée

6 - Conséquences du parasitisme sur les plantes infestées

17

III - La lutte contre *Striga*.....

A - Lutte physique

B - Pratiques culturales

18

C - Lutte biologique.....

D - Variétés résistantes

E - Lutte chimique : utilisation d'herbicides

19

F - Lutte intégrée.....

20

IV - Propriétés pharmacologiques d'extraits de *Striga*.....

A - En médecine traditionnelle

B - Recherche moderne : "nouvelles" propriétés pharmacologiques

1 - Les flavonoïdes chez les plantes

21

2 - Les flavonoïdes chez *Striga*.....

a - *Effets endocriniens et contraceptifs*

23

b - *Effets anti-androgéniques*.....

c - *Effets antiallergiques : stabilisation des mastocytes et inhibition de la libération d'histamine*.....

24

d - *Effets antioxydants*.....

25

3 - Effets antibactériens, antifongiques et trypanocides de *Striga*

26

V - Particularité métabolique : production de mannitol.....

A - Rôles physiologiques du mannitol chez *S. hermonthica*

1 - Réserve de pouvoir réducteur

2 - Forme de transport à longue distance

3 - Agent osmorégulateur et soluté compatible

27

4 - Agent thermoprotecteur.....

B - Origine du mannitol chez *S. hermonthica*

28

C - La M6PR chez les plantes autotrophes et parasites.....

1 - Rôle dans la biosynthèse du mannitol

29

2 - Localisation - Caractéristiques physico-chimiques	
3 - Informations disponibles sur la régulation de la M6PR.....	32

## MATERIEL ET METHODES.....

I - Matériel végétal	33
----------------------	----

### II - Extraction des acides nucléiques.....

A - <u>Extraction des ADN totaux</u>	
B - <u>Extraction des ARN totaux</u>	
C - <u>Synthèse des ADNc et amplification de l'ADNc d'intérêt</u>	34
1 - Synthèse des ADNc	
2 - Amplification de l'ADNc d'intérêt.....	36
a - PCR	
b - Clonage, criblage et extraction du plasmide	
D - <u>PCR sur ADN génomique</u> .....	

### III - Extraction et purification de la M6PR

	37
--	----

A - <u>Extraction</u>	
B - <u>Mesure de l'activité M6PR dans les extraits dessalés</u>	
C - <u>Purification de la M6PR</u> .....	
1 - Fractionnement des protéines	
2 - Immunoprécipitation	
3 - Chromatographie d'affinité	38

### IV - SDS PAGE, immunoblot et microséquençage.....

	39
--	----

A - <u>SDS PAGE</u>	
B - <u>Immunoblot</u> .....	
C - <u>Microséquençage du spot d'intérêt chez <i>S. hermonthica</i></u>	40
1 - Coloration des protéines au Bleu de Coomassie colloïdal, prélèvement et traitement du spot d'intérêt	
2 - Identification des protéines par LC-MS/MS .....	

a - Analyse

b - Identification des peptides

V - Analyse de l'activité cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD)..... 42

A - Extraction et mesure de l'activité CAD

B - Molécules inhibitrices de la CAD et de la M6PR

RESULTATS ..... 43

I - Recherche de la séquence M6PR chez *S. hermonthica* 46

A - Approche moléculaire 48

B - Approche biochimique.....

1 - Analyse SDS PAGE, immunoblot et révélation ECL 49

2 - Purification partielle de la protéine d'intérêt et microséquençage.....

C - Etude de l'activité cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD)..... 51

1 - Mesure de l'activité CAD

2 - Tests d'inhibition de la CAD et de la M6PR..... 52

II - Recherche de facteurs régulant l'activité M6PR chez *Striga hermonthica*..... 56

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 57

CONCLUSION.....

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....

## SOMMAIRE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

<b>Figure 1</b> – Connexion hôte - parasite.....	5
<b>Figure 2</b> – Espèces d'Orobanche les plus nuisibles .....	6
<b>Figure 3</b> – Distribution géographique globale des espèces de <i>Striga</i> à incidence agronomique.....	7
<b>Figure 4</b> – Champs de Sorgho infestés par <i>S. hermonthica</i> .....	9
<b>Figure 5</b> – <i>S. hermonthica</i> au stade floraison sur sorgho .....	10
<b>Figure 6</b> – Fleur de <i>S. hermonthica</i> .....	10
<b>Figure 7</b> – Coupe longitudinale de l' <i>haustorium</i> de <i>S. hermonthica</i> sur une racine de maïs.....	11
<b>Figure 8</b> – Cycle biologique de <i>S. hermonthica</i> .....	12
<b>Figure 9</b> – Structure d'un stimulant de germination, la sorgoléone 358.....	13
<b>Figure 10</b> – Noyau phényl 2 chromone, structure de base des flavonoïdes .....	20
<b>Figure 11</b> – Structure des flavonoïdes à activité contraceptive chez <i>S. orobanchioides</i> .....	22
<b>Figure 12</b> – Synthèse des hormones stéroïdiennes.....	22
<b>Figure 13</b> – Structure du Diéthyl stilbestrol.....	23
<b>Figure 14</b> – Voie de production de mannitol chez <i>S. hermonthica</i> .....	27
<b>Figure 15</b> – Régulation de la répartition du carbone chez les plantes productrices de saccharose et d'amidon.....	30
<b>Figure 16</b> – Amplification par PCR des gènes M6PR sur l'ADN d' <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Apium graveolens</i> , <i>O. ramosa</i> et <i>S. hermonthica</i> .....	42
<b>Figure 17</b> – Analyses SDS PAGE des fractions semi-purifiées.....	43
<b>Figure 18</b> – Analyse SDS PAGE des fractions immunoprécipitées.....	44
<b>Figure 19</b> – Immunoblot et révélation ECL des fractions immunoprécipitées.....	45
<b>Figure 20</b> – SDS PAGE de la fraction enrichie de la protéine d'intérêt de <i>Striga</i> .....	46
<b>Figure 21</b> – Activité spécifique CAD ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ) des fractions protéiques brute et semi-purifiées de <i>Striga</i> .....	48
<b>Figure 22</b> – Pouvoir inhibiteur du DPP sur l'activité CAD.....	49
<b>Figure 23</b> – Pouvoir inhibiteur de l'alcool coniférylique sur l'activité M6PR.....	49
<b>Figure 24</b> – Détermination des facteurs de régulation de l'activité M6PR.....	50
<b>Figure 25</b> – Structure des substrats de la CAD.....	53
<b>Figure 26</b> – Homologie structurale des inhibiteurs de la CAD et de la M6PR.....	53
<b>Tableau 1</b> – Classification des Angiospermes parasites.....	2
<b>Tableau 2</b> – Sensibilité des cultures à <i>Striga</i> .....	8
<b>Tableau 3</b> – Caractéristiques physico-chimiques de la M6PR .....	29
<b>Tableau 4</b> – Propriétés des peptides analysés par LC-MS/MS.....	47
<b>Tableau 5</b> – Propriétés des protéines (isoformes) identifiées par microséquençage.....	52
<b>Planche 1</b> – Quelques espèces d'Angiospermes parasites.....	4

## INTRODUCTION

Depuis quelques dizaines d'années, les Angiospermes parasites font l'objet d'un intérêt croissant. En effet, l'absence de méthodes de lutte efficaces favorise largement leur prolifération et leur extension (Europe, Afrique). L'Orobanche rameuse (*Orobanche ramosa*) est ainsi devenue une réelle menace pour la culture du Colza et du Tabac dans l'ouest de la France.

A Nantes, le Groupe de Physiologie et Pathologie Végétales (GPPV) oriente une partie de ses recherches vers l'identification de cibles biochimiques spécifiques des plantes parasites, afin de mettre au point des méthodes de lutte plus efficaces. Les principaux modèles étudiés sont l'Orobanche rameuse et *Striga hermonthica*. Ces parasites ont la particularité, contrairement à leurs hôtes, de produire du mannitol, polyol dont la biosynthèse repose, chez l'Orobanche, sur une enzyme spécifique : la mannose 6-phosphate réductase dite M6PR.

Mon travail s'inscrit dans un programme de recherche ayant pour objectif la caractérisation de la M6PR chez *Striga hermonthica*. Il comporte deux volets :

- la recherche du gène *M6PR*,
- la régulation de l'activité M6PR.

A ce jour, le gène *M6PR* est caractérisé uniquement chez le céleri et l'Orobanche rameuse. Des amorces "M6PR" générées à partir de ces travaux (2002) sont inadaptées à l'amplification du gène *M6PR* chez *Striga*. Disponibles depuis peu, de nouvelles séquences *M6PR* (*Arabidopsis thaliana*, blé et riz) ont permis de générer de nouvelles amorces qui seront utilisées dans le cadre de ce travail. Une approche biochimique par microséquençage de la protéine d'intérêt sera menée en parallèle. Différentes stratégies de purification (immunoprécipitation et chromatographie d'affinité) seront testées pour isoler cette protéine.

A la différence de la saccharose phosphate synthase et de la nitrate réductase, enzymes majeures de l'assimilation du carbone et de l'azote respectivement, peu d'informations sont disponibles quant à la régulation de la M6PR chez les plantes. Le deuxième volet de cette étude repose sur la mesure de l'activité M6PR *in vitro* dans différents organes du parasite et sous différentes conditions de culture. L'objectif de ce travail préliminaire est d'identifier des facteurs de régulation dont les mécanismes ne pourront être définis qu'après caractérisation du gène d'intérêt et production d'anticorps spécifiques.

# BIBLIOGRAPHIE

## I – Généralités sur les Angiospermes parasites

Au cours de leur évolution, environ 2% des Angiospermes, soit près de 3000 espèces, ont perdu partiellement, voire totalement leur autotrophie et sont devenus des parasites d'autres plantes supérieures (Sallé *et al.*, 2000). Ces plantes se connectent au système vasculaire de leur(s) hôte(s) par l'intermédiaire d'une structure spécialisée appelée sucoir ou *haustorium*. Bien que le degré de dépendance vis-à-vis de l'hôte varie énormément d'une espèce à l'autre, les plantes parasites dépendent au moins partiellement de leur hôte pour leur approvisionnement en eau, minéraux et solutés organiques (Musselman et Press, 1995).

Depuis une cinquantaine d'années, plusieurs facteurs ont favorisé le développement des connaissances sur les Angiospermes parasites : au milieu des années 1950 aux Etats-Unis, les cultures de maïs sont menacées par une plante parasite, *Striga asiatica*. Un Programme National de Recherche est alors mis en place pour développer des méthodes de contrôle. Dans les années 1970-1980, les famines en Afrique ont aussi largement contribué à l'essor des connaissances. Depuis, des collaborations de recherche entre les Pays en Voie de Développement et les laboratoires des pays développés sont établies (Musselman et Press, 1995).

### A - Classification

Les espèces parasites se répartissent en seize familles (Musselman et Press, 1995). Généralement, elles sont classées selon leur capacité photosynthétique et leur site d'attachement à l'hôte (Tableau 1).

**Tableau 1** : Classification des Angiospermes parasites (Molau, 1995)

<b>Lurales</b> - Lauraceae - <i>Cassytha</i>	Holoparasites	Epiphytes
<b>Santalales</b>		
Olacaceae, Opiliaceae, Santalaceae	Hémiparasites	Epirhizes
Misodendraceae, Loranthaceae, Viscaceae, Eremolephidaceae	Hémiparasites	Epiphytes
Balanophoraceae	Holoparasites	Epirhizes
<b>Rafflesiales</b> - Rafflesiaceae, Mitrastemonaceae, Hydnoraceae	Holoparasites	Epirhizes
<b>Polygales</b> - Krameriaceae	Hémiparasites	Epirhizes
<b>Solanales</b> - Cuscutaceae	Holoparasites	Epiphytes
<b>Lamiales</b> - Lennoaceae	Holoparasites	Epirhizes
<b>Scrophulariales</b> - Scrophulariaceae - <i>Rhinanthoideae</i>	Holoparasites ou Hémiparasites	Epirhizes

#### 1 - Selon la capacité photosynthétique : hémiparasitisme et holoparasitisme

Les Angiospermes parasites se divisent en holoparasites et en hémiparasites (Stewart et Press, 1990).

Les espèces holoparasites (*Cassytha sp.*, *Orobanche sp.*, *Cuscuta sp.*, Planche 1-A, B et C) sont toujours des parasites obligatoires, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent se développer sans la présence d'une plante hôte. Elles sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone car dépourvues de chlorophylle.

Les hémiparasites, majoritaires, peuvent être facultatifs (*Rhinantus sp.*, *Pedicularis sp.*, *Euphrasia sp.*, Planche 1-D, E et F) si la présence d'une plante hôte n'est pas indispensable à la réalisation complète de leur cycle de développement, ou obligatoires (*Striga sp.*, *Viscum sp.*, *Thesium sp.*, Planche 1-G, H et I) dans le cas contraire. Pendant leur phase de croissance souterraine, les hémiparasites sont dépourvus de chlorophylle et sont donc totalement hétérotrophes vis-à-vis de leur hôte. Ils deviennent chlorophylliens après émergence, moment à partir duquel l'hétérotrophie diminue grâce à l'acquisition d'un système photosynthétique fonctionnel (Pageau *et al.*, 1998).



A - *Cassytha filiformis*



B - *Orobanche hederaceae*



C - *Cuscuta epithymum*



D - *Rhinanthus crista galli*



E - *Pedicularis oederi*



F - *Euphrasia officinalis*



G - *Striga gesnerioides*



H - *Viscum album*



I - *Thesium chinense*

Planche 1 – Quelques espèces d'Angiospermes parasites

## 2 - Selon le site d'attachement à l'hôte

Les plantes à fleurs parasites sont également classées selon leur site d'attachement à l'hôte (Stewart et Press, 1990). Il faut donc distinguer les parasites de tiges ou épiphytes (*Cassytha sp.*, *Cuscuta sp.*, Planche 1-A et C) des parasites de racines ou épirhizes (*Orobanche sp.*, *Striga sp.*, Planche 1-B et G).

### B - Particularité parasitaire : l'*haustorium*

Les plantes parasites se fixent aux racines ou aux tiges d'une plante hôte par l'intermédiaire d'un organe qui leur est propre, le suçoir ou *haustorium*. Elles se connectent aux vaisseaux conducteurs (xylème ou phloème) pour y puiser l'eau et les nutriments nécessaires à leur développement (Figure 1).

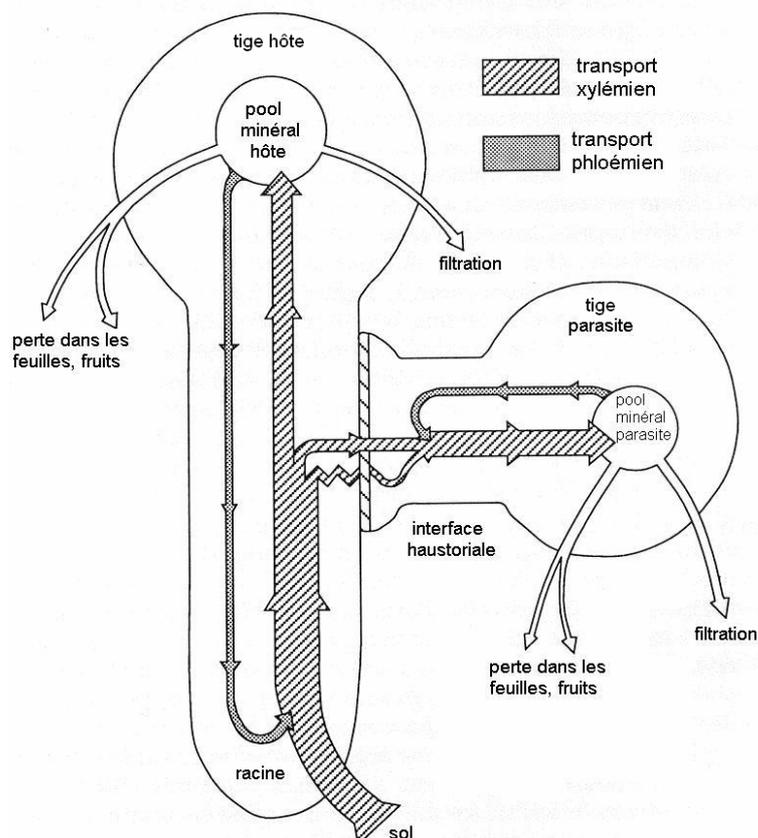


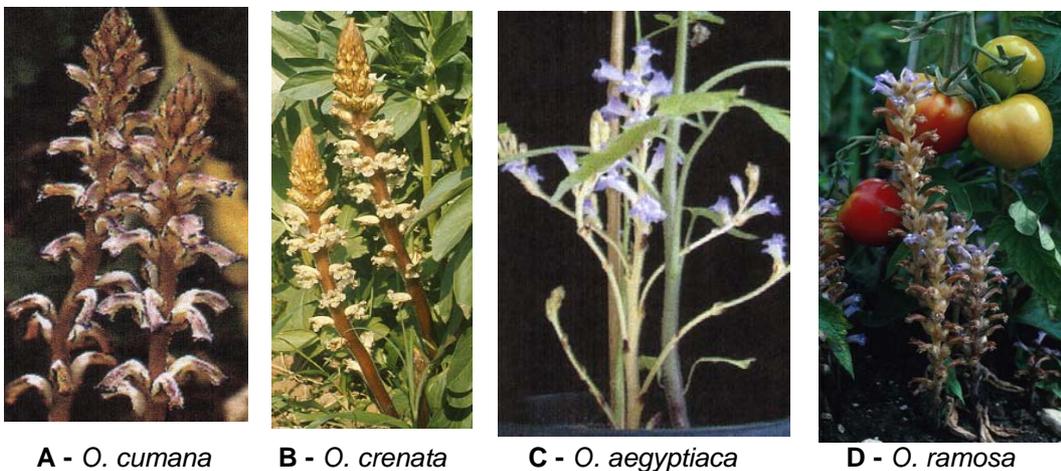
Figure 1 – Connexion hôte - parasite

L'*haustorium* est constitué d'un noyau vasculaire entouré de tissu hyalin et d'une partie en contact avec l'hôte, l'endophyte. Il permet l'attachement à l'hôte, la pénétration par l'endophyte et le transfert de solutés vers le parasite (Stewart et Press, 1990).

### C - Conséquences économiques du parasitisme

Certains parasites posent de sérieux problèmes agricoles, en particuliers dans le Tiers Monde où ils attaquent et dévastent les cultures céréalières.

En Europe, l'Orobanche, un holoparasite de racine, s'attaque à de nombreuses cultures. *Orobanche cumana* (Figure 2-A) parasite le tournesol en région méditerranéenne, au sud de l'Espagne, en Grèce, en Italie et en Turquie. Sur cette même zone, les légumineuses (pois, haricots, fèves, lentilles et vesces) ne sont pas épargnées par *Orobanche crenata* (Figure 2-B) ou encore *Orobanche aegyptiaca* (Figure 2-C), holoparasite également présent en Australie et en Californie. *Orobanche ramosa* (Figure 2-D) cause des dégâts importants sur le colza dans l'ouest de la France. Elle se retrouve aussi sur le chanvre, la luzerne, la pomme de terre et la tomate (Hiron, 2003).



**Figure 2** – Espèces d'Orobanche les plus nuisibles

Les études actuelles menées sur les plantes parasites sont donc justifiées. Elles visent notamment à identifier, chez les parasites, des cibles biochimiques spécifiques absentes des plantes hôtes, et à définir, chez les plantes peu sensibles, des caractères de résistance.

## II – Modèle d'étude : *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae)

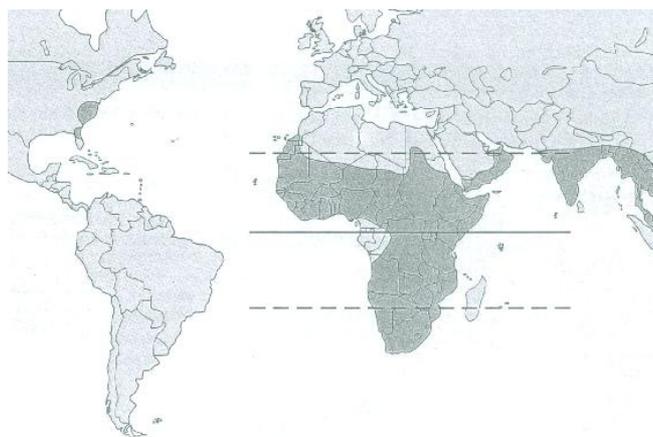
### A - Les Scrophulariacées parasites - Le genre *Striga*

#### 1 - Taxonomie

Les Scrophulariacées sont des Dicotylédones, il s'agit d'une famille très riche et largement répandue. Les représentants parasites appartiennent à la sous-famille des Rhinantoïdées qui compte environ 100 genres et 1500 espèces (Molau, 1995). Ce sont des holoparasites (*Orobanche sp.*, *Orobanchaceae*, Planche 1-B et Figure 2), des hémiparasites facultatifs le plus souvent (*Pedicularis sp.*, Planche 1-E), ou des hémiparasites obligatoires dont un des plus importants est le genre *Striga* (Planche 1-G). Il existe environ cinquante espèces de *Striga* (*Witchweed*, *Herbe aux sorcières*), toutes épiphytes, annuelles pour la plupart (Ba, 1984).

#### 2 - Répartition géographique - Plantes hôtes - Impact économique

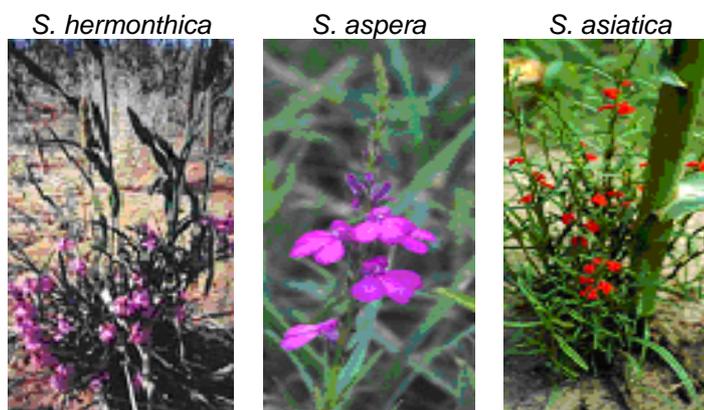
*Striga* se rencontre surtout dans les régions semi-arides d'Afrique et d'Inde, mais aussi aux Etats-Unis à cause de l'importation de cultures contaminées (Musselman et Press, 1995) (Figure 3). Ces dernières années, sous la pression démographique africaine, l'exploitation massive de cultures de variétés de maïs sensibles a largement contribué à son extension (Riches et Parker, 1995).



**Figure 3** – Distribution géographique globale des espèces de *Striga* à incidence agronomique (*S. hermonthica*, *S. asiatica*, *S. aspera* et *S. gesnerioides*)

Bien que plus d'une trentaine d'espèces de *Striga* soient présentes en Afrique, seulement quatre sont considérées comme responsables de la plupart des dégâts observés (Thalouarn et Fer, 1993). Les espèces *S. hermonthica*, *S. asiatica* et *S. aspera* parasitent principalement les cultures céréalières (maïs, sorgho, mil, riz) et parfois la canne à sucre (Tableau 2), alors que *S. gesnerioides* (Planche 1-G) est un fléau pour les légumineuses, le tabac et la patate douce. En Afrique, *Striga* est donc considéré comme la menace la plus sérieuse pour les cultures agricoles (Musselman et Press, 1995).

**Tableau 2** - Sensibilité des cultures à *Striga* (Riches et Parker, 1995)



	<i>S. hermonthica</i>	<i>S. aspera</i>	<i>S. asiatica</i>
Maïs	+++	++	+++
Sorgho	+++	+	+++
Millet	+++	+	++
Riz	++	++	++
Canne à sucre	++	+	+

Le contrôle est difficile, en particulier à cause de la production d'un très grand nombre de graines, dispersées par le vent ou les animaux (Molau, 1995) et qui peuvent rester viables dans le sol plusieurs dizaines d'années avant de germer (Riches et Parker, 1995).

Aujourd'hui, la méthode de lutte la plus pratiquée reste l'arrachage manuel des tiges émergées avant la libération des graines, et l'utilisation d'engrais azotés pour augmenter la vigueur des céréales hôtes (Riches et Parker, 1995). Des cultivars tolérant un certain degré de parasitisme sont aussi

développés, mais ils sont à l'origine d'une augmentation du degré de contamination des sols par les graines de *Striga* (Musselman et Press, 1995).

D'un point de vue économique, il est difficile d'estimer précisément les dégâts causés par *Striga*. Il s'agit certainement de plusieurs milliards de dollars perdus chaque année par l'agriculture africaine, ce qui justifie les efforts fournis pour mieux connaître et combattre ce parasite.

Dans bien des exploitations agricoles, des infestations entraînent la perte intégrale des récoltes (Figure 4). A cause de *Striga*, des champs mis en jachère, des exploitations, voire des villages entiers ont été abandonnés dans plusieurs pays d'Afrique (Thalouarn et Fer, 1993).



**Figure 4** – Champs de Sorgho infestés par *S. hermonthica*

## **B - Modèle d'étude : *Striga hermonthica***

### 1 - Classification - Plantes hôtes

*Striga hermonthica* est un parasite obligatoire appartenant à la famille des *Scrophulariaceae* (Figures 5 et 6). C'est un parasite chlorophyllien de racines (hémiparasite épiphize) qui infeste les céréales de type photosynthétique C<sub>4</sub> telles que le sorgho (*Sorghum bicolor*), le maïs, (*Zea mais*) et le millet (*Pennisetum sp.*). Il parasite aussi la canne à sucre (*Saccharum officinarum*).



**Figure 5** - *S. hermonthica* au stade floraison sur sorgho



**Figure 6** – Fleur de *S. hermonthica*

## 2 - Description

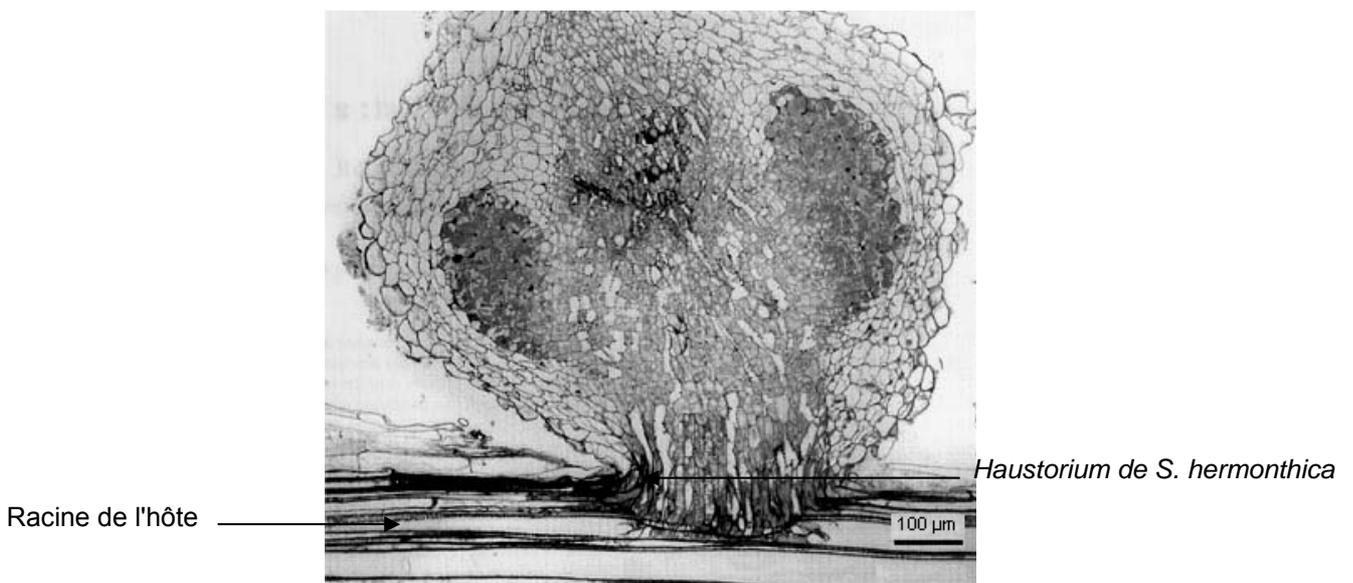
### a - *Partie aérienne*

*S. hermonthica* est une plante chlorophyllienne qui peut atteindre 80 cm de hauteur. La partie végétative est constituée d'une tige axiale principale, circulaire à la base et quadrangulaire à partir de 2-3 cm de hauteur du sol. Cette tige est prolongée par une inflorescence terminale qui exerce une dominance apicale sur les bourgeons axillaires (Ba, 1984). Les feuilles opposées sont linéaires, longues de 3 à 10 cm et larges de 0.5 à 2 cm. La taille des feuilles et de la plante varie selon les conditions environnementales et la plante hôte. Les tiges et les feuilles sont couvertes de courts poils raides.

Les inflorescences sont des grappes pouvant comporter jusqu'à 60 fleurs pour l'inflorescence terminale et 10 à 20 pour les inflorescences latérales. Les fleurs sont zygomorphes (Figure 6) avec une corolle gamopétale bilabée, la lèvre inférieure étant trilobée. Elles sont généralement roses, parfois blanches (Ba, 1984). Le pistil médian formé de deux carpelles comporte un ovaire supère biloculaire, un style et un stigmate. Les quatre étamines sont insérées sur la corolle et séparées les unes des autres, les quatre anthères uniloculaires sont tétrasporangées. Le fruit est une capsule déhiscente contenant plus de 50 graines.

*b - Partie souterraine*

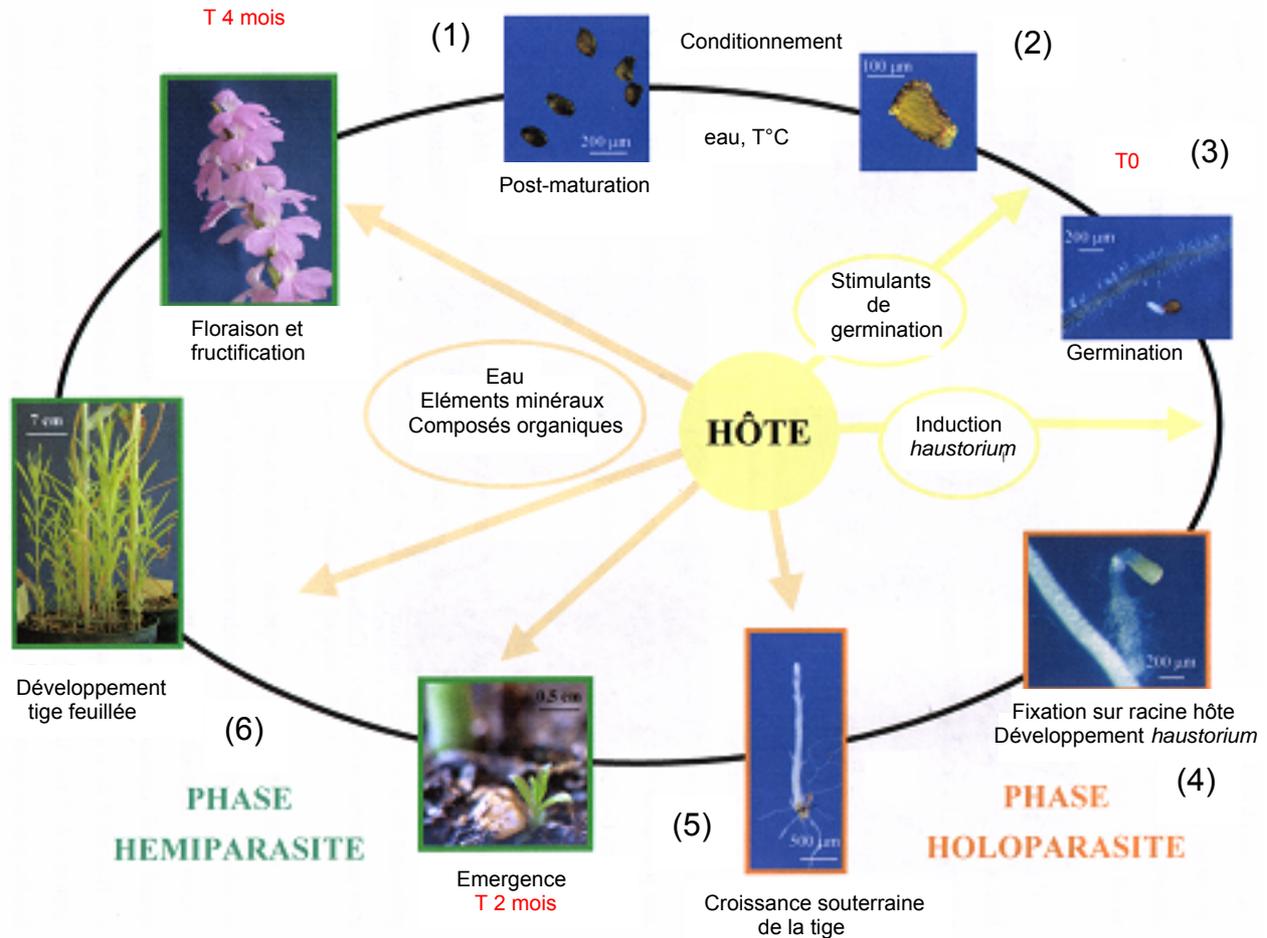
L'appareil racinaire de *S. hermonthica*, fibreux, est peu développé. Le radicule qui émerge à la germination produit un *haustorium* primaire (Figure 7). Les autres racines qui partent de la base de la tige se développent au contact des racines hôtes et produisent de nombreux *haustoria* secondaires (Ba, 1984). Tous les *haustoria* ont approximativement la même taille (1-2 mm), quelles que soient les conditions écologiques. Cependant, ils peuvent être plus petits sur certains hôtes. En général, les *haustoria* sont nombreux, ils peuvent être supérieurs à 80 par plant. A l'intérieur, il n'existe que des connexions symplastiques qui relient le xylème du *Striga* à celui de l'hôte.



**Figure 7** – Coupe longitudinale de l'*haustorium* de *S. hermonthica* sur une racine de maïs

### 3 - Cycle de développement

Le cycle de développement de *S. hermonthica* comporte six étapes (Figure 8) :



**Figure 8** - Cycle biologique de *S. hermonthica* (Rousset, 2003)

#### a - *Dormance* (1)

A la fin de la saison des pluies, les graines sont libérées en grande quantité et entrent en dormance dans le sol pour une période pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines d'années.

## b - Conditionnement (2)

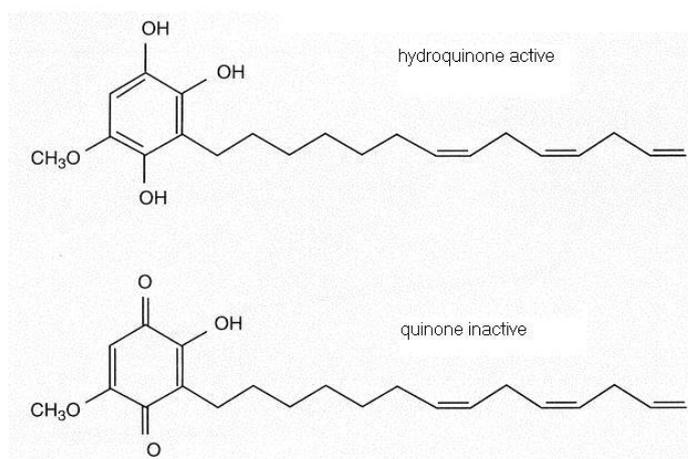
Lorsque la nouvelle saison des pluies commence, une forte humidité et une température adéquate (25-35°C) permettent le préconditionnement des graines qui deviennent sensibles à un signal chimique émis par les racines d'une plante hôte à proximité.

## c - Germination (3)

Ces stimulants de germination présents dans les exsudats racinaires de la plante hôte induisent alors la germination des graines.

Le premier stimulant naturel de germination, le strigol, fut isolé d'exsudats racinaires du cotonnier (*Gossypium hirsutum*, *Malvaceae*) (Cook *et al.*, 1966). Depuis, d'autres stimulants naturels ont été identifiés : la sorgolactone chez le sorgho (*Sorghum bicolor*) hôte de *S. hermonthica* et de *S. asiatica* (Hauck *et al.*, 1992 cité par Yokota *et al.*, 1998), l'alectrol et l'orobanchol chez le trèfle (*Trifolium pratense*) hôte d'*Orobanche minor* (Yokota *et al.*, 1998)

Des analogues structuraux, désignés par le terme "GR" pour leur activité (*Growth Regulatory activity*) ont aussi été synthétisés (Boone *et al.*, 1995). Au laboratoire, le GR 24 est utilisé *in vitro* pour induire la germination des graines de *Striga* et d'*Orobanche*. D'un point de vue chimique, les stimulants de germination sont des substances phénoliques (Figure 9) regroupées sous le nom générique de sorgoléones, qui diffèrent les unes des autres par leur masse moléculaire.



**Figure 9** - Structure d'un stimulant de germination, la sorgoléone 358

Ces substances sont actives sous forme réduite hydroquinonique et inactives sous forme oxydée quinonique (Figure 9). Les sorgoléones exsudées par la racine de l'hôte sous la forme hydroquinone sont ainsi très rapidement inactivées par oxydation au fur et à mesure qu'elles s'éloignent de la racine par diffusion (Fate *et al.*, 1990 cité par Thalouarn et Fer, 1993). Ainsi, par diffusion, l'existence d'un gradient décroissant de concentration en sorgoléone active à proximité de la racine de l'hôte explique le fait que seules les graines de *Striga* situées à proximité de cette racine germent.

#### *d - Fixation à la racine hôte et formation du suçoir primaire (4)*

La racine du parasite se développe ensuite vers la plante hôte grâce à un gradient de concentration croissant des stimulants de germination. Au contact d'une racine hôte, le parasite forme un endophyte qui se connecte aux vaisseaux xylémiens de la plante parasitée pour former un suçoir ou *haustorium* (Figure 7).

#### *e - Développement de l'appareil végétatif, floraison et fructification (5)(6)*

Le parasite développe alors une tige souterraine blanchâtre et écailleuse, puis émerge au bout de quatre à six semaines pour donner une partie aérienne capable de photosynthèse. La floraison se fait six à huit semaines après émergence. Le pollen est véhiculé par les insectes et les oiseaux, les graines par le vent et les animaux.

#### 4 - Capacité photosynthétique de *S. hermonthica*

L'existence d'un seul type de chloroplaste, la faible activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) (Press *et al.*, 1986) et l'existence d'une photorespiration (Press *et al.*, 1987) montrent que le métabolisme photosynthétique de *S. hermonthica* est de type C<sub>3</sub>. La photosynthèse mesurée est trop faible pour assurer l'autotrophie du parasite. Le prélèvement simultané de molécules carbonées chez la plante hôte est donc nécessaire (Pageau *et al.*, 1998).

## 5 - Relations trophiques entre *S. hermonthica* et son hôte

### a - *Approvisionnement hydrominéral*

*Striga* dépend entièrement de son hôte pour son approvisionnement en eau et minéraux car son appareil racinaire est peu développé et non fonctionnel (absence de poils absorbants). Chez le parasite, la forte accumulation de potassium, de magnésium et de mannitol induit un potentiel osmotique très négatif à l'origine d'un transfert d'eau et de substances dissoutes à partir du xylème de l'hôte (Stewart *et al.*, 1984). Ce transfert est intensifié par une transpiration très élevée et non régulée chez *Striga* (Press *et al.*, 1987, Thalouarn et Fer, 1993). La fanaison précoce des feuilles chez la plante hôte est une des manifestations du stress hydrique entretenu par le parasite.

### b - *Alimentation carbonée*

Pendant la phase de croissance souterraine, *Striga* est totalement hétérotrophe vis-à-vis du carbone et son alimentation carbonée repose essentiellement sur un prélèvement de saccharose (Okonkwo, 1966). Après émergence, cette dépendance diminue grâce à l'acquisition d'un système photosynthétique fonctionnel (Pageau *et al.*, 1998).

### c - *Alimentation azotée*

L'azote inorganique prélevé chez l'hôte sous forme de nitrate est réduit et incorporé majoritairement dans l'asparagine (Pageau *et al.*, 2003). La capacité d'assimilation de l'azote minéral est néanmoins relativement limitée chez *Striga* (*Igbinosa* et Thalouarn, 1996), d'où l'efficacité de la fertilisation azotée dans la lutte contre ce parasite.

## 6 - Conséquences du parasitisme sur les plantes infestées

Les symptômes du parasitisme sont détectables très rapidement, quelques jours seulement après la fixation du parasite (Frost *et al.*, 1997).

Les plantes infestées sont plus petites, la biomasse de la partie aérienne est très affectée contrairement à celle de la partie souterraine. Le parasite se comporte comme un organe "puits" supplémentaire au niveau racinaire, il détourne les nutriments des parties aériennes, vers les racines. Le dessèchement et l'accélération de la fanaison des feuilles chez l'hôte témoignent du stress hydrique entretenu par le parasite. La production des graines est d'autre part très diminuée voire nulle.

### III – La lutte contre *Striga*

Les graines, légères et nombreuses, sont facilement disséminées par le vent et peuvent rester en dormance dans le sol pendant plusieurs années. Il est donc difficile d'empêcher la propagation de ces parasites.

#### A - Lutte physique

L'arrachage manuel des plants de *Striga* émergés permet, après plusieurs années, de réduire sensiblement la contamination du sol (Lagoke *et al.*, 1991). Cette méthode reste cependant d'une efficacité limitée.

Il est aussi possible d'appliquer un film de polyéthylène sur les champs humides lors de la saison chaude. Cette solarisation du sol permet alors d'atteindre une température létale pour les graines de *Striga* enfouies à moins de dix centimètres de profondeur (Eplee et Norris, 1995).

#### B - Pratiques culturales

Le labour profond des sols limite le nombre de graines à proximité des racines hôtes. Une forte irrigation et l'apport massif d'engrais azotés (100 à 300 kg d'azote ha<sup>-1</sup>) sont néfastes au développement de *Striga* (Singh *et al.*, 1991). Il est aussi possible de semer les plantes hôtes avant la saison des pluies, lorsque les conditions ne sont pas favorables à la germination des graines du parasite.

Certaines plantes dites "faux hôtes" induisent la germination des graines du parasite mais ne permettent pas leur attachement. *Striga* meurt ainsi par épuisement en quelques jours : c'est la germination suicide. Il est possible d'alterner la culture de ces "faux hôtes" avec les espèces sensibles, ou de pratiquer une co-culture. Cette méthode ne se montre cependant vraiment efficace sur la réduction du stock de graines dans le sol qu'après plusieurs années, et pose problème quant à la disponibilité des terres cultivables.

## **C - Lutte biologique**

L'utilisation de pathogènes spécifiques de *Striga* est aussi envisagée. Il peut s'agir de champignons comme *Fusarium sp.* (Sauerborn, 2001), d'insectes comme *Smicronyx sp.*, de bactéries, voire même de virus.

## **D - Variétés résistantes**

L'exploitation de plantes hôtes résistantes est une des méthodes de lutte les plus prometteuses et fait actuellement l'objet de nombreux travaux (Hausmann *et al.*, 2004). La recherche de gènes de résistance à *Striga* est ainsi plus avancée que pour *Orobanche*. Cependant, les variétés identifiées actuellement comme résistantes ne sont pas exploitables en agro-alimentaire et le transfert de la résistance à des cultivars exploitables reste un échec à ce jour.

## **E - Lutte chimique : utilisation d'herbicides**

L'injection d'éthylène dans le sol conduit à la germination suicide des graines, mais son utilisation nécessite des moyens techniques inadaptés à l'économie africaine. L'application d'anti-transpirants sur les feuilles de *Striga*, caractérisé par une forte intensité transpiratoire, s'avère aussi efficace mais trop tardive pour réduire significativement l'impact de l'infestation sur l'hôte (Eplee, 1984).

Les herbicides actifs contre *Striga* sont majoritairement des inhibiteurs de la division cellulaire. Ils peuvent être appliqués à différents stades du développement de l'hôte (Eplee, 1984) :

- avant le semis de la culture de la plante hôte pour la trifluraline et la penthiméthaline,
- après le semis et avant l'émergence de la culture pour la trifluraline, la penthiméthaline, le chlorsulfuron et le metsulfuron-méthyl
- après émergence des semis et avant émergence du parasite. Dans ce cas, l'application sur les feuilles de l'hôte, de dicamba, un herbicide systémique non sélectif, réduit le degré d'infestation (Eplee et Norris, 1995).

## **F - Lutte intégrée**

Aucune de ces méthodes ne parvient à éradiquer totalement *Striga*. C'est pourquoi les programmes de lutte associant plusieurs techniques et tenant compte de la réalité économique des régions concernées semblent plus prometteurs.

## IV – Propriétés pharmacologiques d'extraits de *Striga*

### A – En médecine traditionnelle

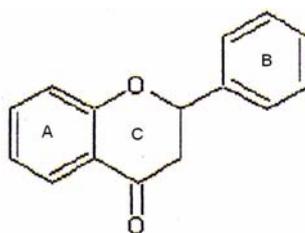
Au XIX siècle, la littérature raconte qu'en Chine, les feuilles de *Striga asiatica* (Tableau 2) étaient utilisées pour soigner les douleurs et les ulcères (Teo, 1993). En Malaisie, les feuilles de *S. asiatica* étaient utilisées en infusion pour soigner les troubles rénaux, le manque d'appétit, les crampes musculaires, les fièvres, mais aussi comme aphrodisiaque et utérotonique lors des accouchements (Teo, 1993). Par ailleurs, certains parasites de racines accumulent des tanins utilisés comme anti-diarrhéiques.

### B – Recherche moderne : "nouvelles" propriétés pharmacologiques

Actuellement, les principales propriétés pharmacologiques étudiées chez *Striga* sont attribuées à la présence de deux flavonoïdes dans les extraits éthanoliques testés : l'apigénine et la lutéoline.

#### 1 – Les flavonoïdes chez les plantes

Les flavonoïdes sont des pigments jaunes polyphénoliques dérivés du noyau phényl 2 chromone (Figure 10) très répandus dans le règne végétal. Ils se trouvent surtout dans les organes jeunes, dans les zones externes (épiderme et mésophylle des feuilles) et s'accumulent dans les vacuoles sous forme de flavonosides. Ils sont parfois présents dans la cuticule sous forme de génines métoxylées. Les flavonoïdes protègent des rayons UV et des radicaux libres. Ils seraient impliqués dans l'attraction des insectes pollinisateurs et dans la régulation de systèmes enzymatiques.



**Figure 10** – Noyau phényl 2 chromone, structure de base des flavonoïdes

La plupart des activités pharmacologiques font intervenir des propriétés inhibitrices enzymatiques ou antioxydantes. Ainsi, l'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes repose sur l'inhibition de la 5 lipoxygénase (EC 1.13.11.34, synthèse des leucotriènes) et de la cyclo-oxygénase (EC 1.14.99.1, synthèse des prostaglandines). En piégeant les anions superoxydes, les flavonoïdes ont également une action anti-radicalaire. Les propriétés anti-allergiques des flavonoïdes sont dues à l'inhibition de l'histidine décarboxylase (EC 4.1.1.22, synthèse d'histamine) et de la libération d'histamine par les mastocytes. L'effet antispasmodique par relaxation des fibres lisses impliquerait une inhibition de la phosphodiesterase (E.C.3.1.4.17, dégradation de l'AMPc). Cette propriété serait responsable d'une vasodilatation, expliquant en particulier l'effet diurétique des flavonoïdes. D'autres effets ont été observés *in vitro* (anti-aggrégant plaquettaire, hépatoprotecteur, gastroprotecteur, antiviral, anticarcinogène), mais ils ont un intérêt incertain compte tenu de la faible biodisponibilité ( $\approx 10\%$  pour les génines,  $35\%$  pour les hétérosides) des flavonoïdes.

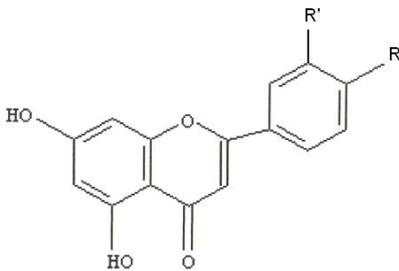
Les flavonoïdes sont utilisés en thérapeutique essentiellement dans la fragilité capillaire, l'insuffisance veineuse et les hémorroïdes. C'est le cas de la diosmine dérivée de l'hespéridoside du péricarpe des fruits de *Citrus sp.* (DAFLON<sup>®</sup>), de la rutine des feuilles d'Eucalyptus ou de Sarrazin (ESBERIVEN<sup>®</sup>), ou des flavonoïdes des feuilles de *Gingko biloba* (GINGKOR<sup>®</sup>). Ils constituent le support de nombreux autres emplois de plantes médicinales en phytothérapie.

## 2 – Les flavonoïdes chez *Striga*

### a - Effets endocriniens et contraceptifs (Hiremath et al., 2000)

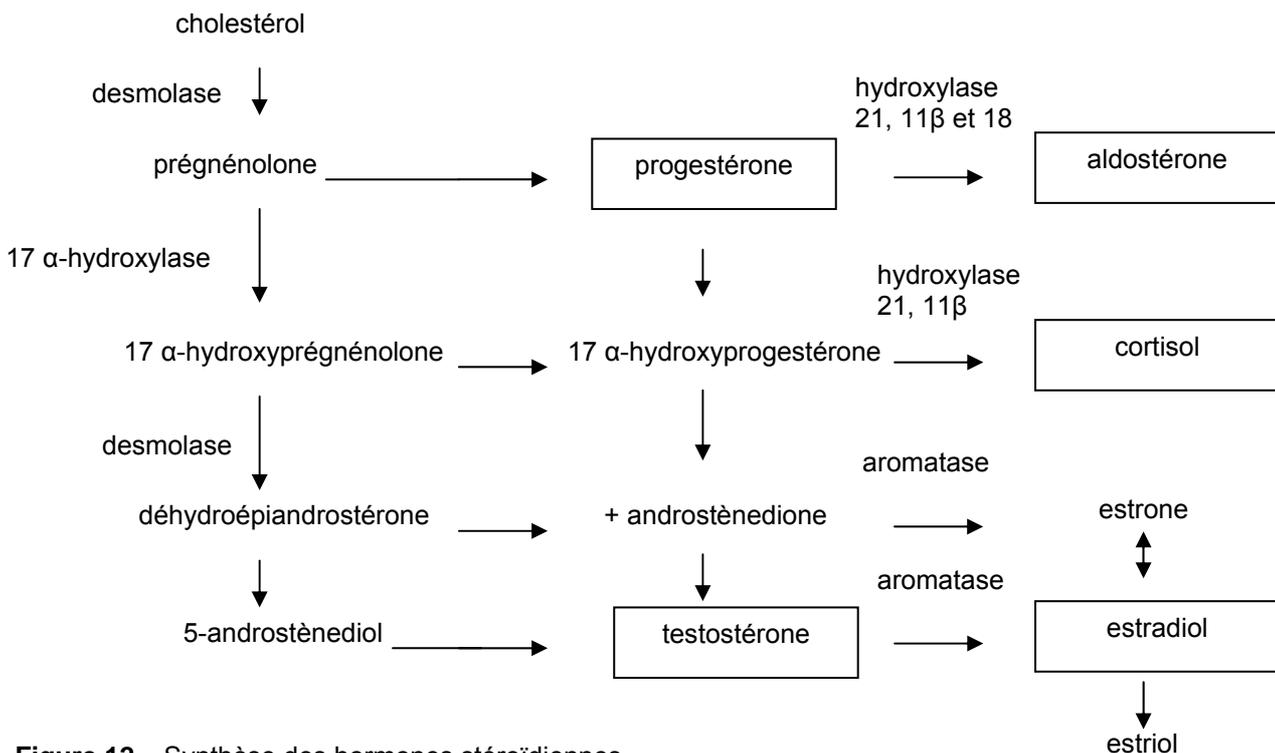
De nombreux travaux ont montré que l'effet contraceptif de certaines plantes était dû à la présence de flavonoïdes. C'est le cas de la butine isolée de *Butea monosperma* (Bhargava, 1986), de la puérarine et de la diadzéine isolées de *Pueraria uberosa* (Shukla, 1993).

Chez *Striga orobanchioides*, les substances contraceptives présentes dans l'extrait éthanolique sont aussi des flavonoïdes, l'apigénine et la lutéoline, à structure stéroïdique (Figure 11). Ces deux substances administrées à doses croissantes ( $5 \text{ à } 25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) à des rats femelles gravides ont un effet anti-implantatoire dose-dépendant. A dose contraceptive, elles manifestent, chez les rats femelles immatures ovariectomisées, une activité œstrogénique qui se traduit par une augmentation du poids et du diamètre utérin, ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de l'endomètre.



**Figure 11** – Structure des flavonoïdes à activité contraceptive chez *S. orobanchioides*.  
Apigénine : R = OH , R' = H – Lutéoline : R = R' = OH

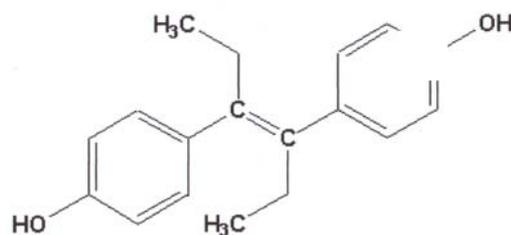
Plusieurs flavones, dont l'apigénine, inhibent l'aromatase humaine (ou œstrogène-synthase, EC 1.14.14.1). Elles pourraient donc entrer en compétition avec les stéroïdes pour la fixation à certaines hydroxylases (Figure 12) et altérer ainsi le métabolisme des hormones stéroïdiennes (Kellis et Vickery, 1984).



**Figure 12** – Synthèse des hormones stéroïdiennes

Les estrogènes exercent leurs effets en se fixant sur un récepteur nucléaire. Plusieurs flavonoïdes, dont l'apigénine et la lutéoline, simulent les effets biologiques du 17- $\beta$ -estradiol en se liant à ce récepteur (Miksicek, 1993). Cependant, ces deux substances n'ont qu'une faible activité estrogénique et agissent donc comme des antagonistes compétitifs des estrogènes. En effet, leur association à l'éthinyl-estradiol provoque des manifestations estrogéniques moindres que celles observées chez les rattes traitées à l'éthinyl-estradiol seul. Ainsi, ces substances ont des propriétés estrogéniques administrées seules à dose contraceptive, elles ont un effet anti-estrogénique associées à l'éthinyl-estradiol. D'autres isoflavones comme la génistéine, la diadzéine et la formononétine ont aussi une activité estrogénique faible (Farmakalidis *et al.*, 1985; Pathak *et al.*, 1993; Shukla, 1993) .

La ressemblance structurale de ces deux flavones (Figure 11) avec les estrogènes dérivés du dihydroxystilbène, c'est-à-dire le diéthylstilbestrol (Figure 13) et l'hexestrol, peut expliquer leur caractère estrogénique. L'effet anti-implantatoire de l'apigénine et de la lutéoline pourrait donc être dû à cette activité.



**Figure 13** – Structure du Diéthyl stilbestrol

Des observations analogues ont été faites avec des extraits éthanoliques de *Striga densiflora*, suggérant aussi la présence de flavonoïdes (Hiremath *et al.*, 1996).

#### *b - Effets anti-androgéniques* (Hiremath *et al.*, 1997a)

Un extrait éthanolique de plante entière de *S. orobanchioides* administré oralement pendant sept jours à des rats mâles immatures (200 mg kg<sup>-1</sup>) entraîne une diminution du poids des testicules et des organes androgènes-dépendants comme l'épididyme, les vésicules séminales et la prostate ventrale.

Les rats traités montrent également une dégénérescence des tubes séminifères qui se compactent et s'atrophient. Les cellules de Leydig et leur noyau dégèrent et deviennent incapables de synthétiser des androgènes, ce qui se traduit par une diminution du nombre de spermatocytes et de spermatides car les androgènes sont indispensables à la spermatogenèse.

L'extrait éthanolique de *S. orobanchioides* testé précédemment sur des rats femelles a montré une activité estrogénique attribuée à la présence de deux flavones, l'apigénine et la lutéoline (Hiremath *et al.*, 1996). Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur effet anti-androgénique sur les rats mâles. Ainsi, l'activité anti-androgénique de *S. orobanchioides* est probablement due à l'activité estrogénique des flavones ou des flavonoïdes.

*c - Effets antiallergiques : stabilisation des mastocytes et inhibition de la libération d'histamine* (Harish *et al.*, 2001)

Les extraits éthanoliques et aqueux de plante entière de *S. orobanchioides* inhibent les contractions de l'iléon de cobaye induites par l'histamine de manière dose-dépendante (2,5 à 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Chez les rats traités avec un sérum équin antigénique, l'administration de l'extrait éthanolique (et dans une moindre mesure de l'extrait aqueux) inhibe la dégranulation mastocytaire de manière dose-dépendante.

Ces deux extraits permettraient donc de prévenir la réaction allergique de type I (hypersensibilité). Les plantes contenant des flavonoïdes, dont l'apigénine et la lutéoline, inhibent la libération d'histamine par les polynucléaires basophiles. Ces substances ont donc un effet antiallergique *in vivo* (Havsteen, 1983; Pathak *et al.*, 1991; Cheong *et al.*, 1998). Plusieurs études tentent de prouver que les effets décrits sont bien dus à la présence de flavonoïdes.

#### d - Effets antioxydants (Badami *et al.*, 2003)

Les plantes contenant des flavonoïdes ont des propriétés antioxydantes car ces substances sont capables de piéger les radicaux libres. L'administration de l'extrait éthanolique de *S. orobanchioides* à des rats (100 mg kg<sup>-1</sup>) entraîne une augmentation de l'activité de la catalase (EC 1.11.1.6, réduction du peroxyde d'hydrogène en eau) et de la quantité d'acide ascorbique (antioxydant) dans le foie et les reins, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1, réduction des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène), dans le foie. Bien que le mécanisme d'action soit inconnu, ces résultats suggèrent une forte activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *S. orobanchioides*, probablement due à la présence de ces deux flavonoïdes.

#### 3 - Effets antibactériens, antifongiques et trypanocides de *Striga*

Des extraits alcooliques de plante entière de *Striga hermonthica* montrent, *in vitro*, une activité antibactérienne envers *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* et *Streptococcus sp.*. Par contre, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Mucor sp.*, *Neisseria sp.*, *Staphylococcus aureus* et *Streptobacillus sp.* ne sont pas sensibles. L'extrait montre également une activité antifongique envers *Aspergillus niger*, mais il est inactif sur *Psoriasis vulgaris* (Hussain et Deeni, 1991).

Des extraits éthanoliques de *Striga sulphurea* montrent aussi une activité antimicrobienne *in vitro* sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et *A. niger*, ainsi que sur *S. aureus* (Hiremath *et al.*, 1997b).

Un extrait méthanolique de feuilles de *Striga sp.* (espèce non précisée) inhibe fortement la mobilité de *Trypanosoma brucei brucei* (agent de la maladie du sommeil) *in vitro* (Atawodi *et al.*, 2003). Cependant, l'exploitation potentielle de l'effet trypanocide chez l'homme nécessite des études complémentaires *in vivo*.

## V – Particularité métabolique : production de mannitol

Chez de nombreux végétaux autotrophes, le saccharose et l'amidon sont les produits principaux de la photosynthèse. Certaines espèces synthétisent en plus, un ou plusieurs polyalcools. Les polyols cycliques (cyclitols), ou linéaires (alditols) comme le mannitol, ont des fonctions physiologiques semblables à celles du saccharose, mais constituent en plus une réserve de pouvoir réducteur et sont impliqués dans la résistance aux stress abiotiques (salinité, sécheresse).

### A – Rôles physiologiques du mannitol chez *S. hermonthica*

#### 1 - Réserve de pouvoir réducteur

Grâce à leur capacité réductrice par oxydation réversible de cofacteurs nucléotidiques, les polyols génèrent et portent du pouvoir réducteur (Loescher et Everard, 1996). Les parasites producteurs de mannitol métabolisent lentement ce sucre, qui constitue donc une réserve à long terme de pouvoir réducteur (Harloff et Wegmann, 1993; Simier *et al.*, 1998).

#### 2 - Forme de transport à longue distance

Chez les plantes autotrophes, le mannitol est transporté des feuilles aux organes puits par le phloème (Noiraud *et al.*, 2001). Quelques travaux suggèrent l'existence d'un tel transport chez les plantes parasites (Hodgson, 1973 ; Fer *et al.*, 1994 ; Press, 1989).

#### 3 - Agent osmorégulateur et compatible

La fonction primordiale du mannitol en tant qu'*osmoticum* majeur chez *S. hermonthica* est évoquée en II.B.5.a. Certains auteurs prêtent également au mannitol un rôle de soluté compatible dans les cellules foliaires du parasite : son accumulation dans le cytosol assurerait un équilibre osmotique avec le compartiment vacuolaire très riche en ions potassium et magnésium (Nour *et*

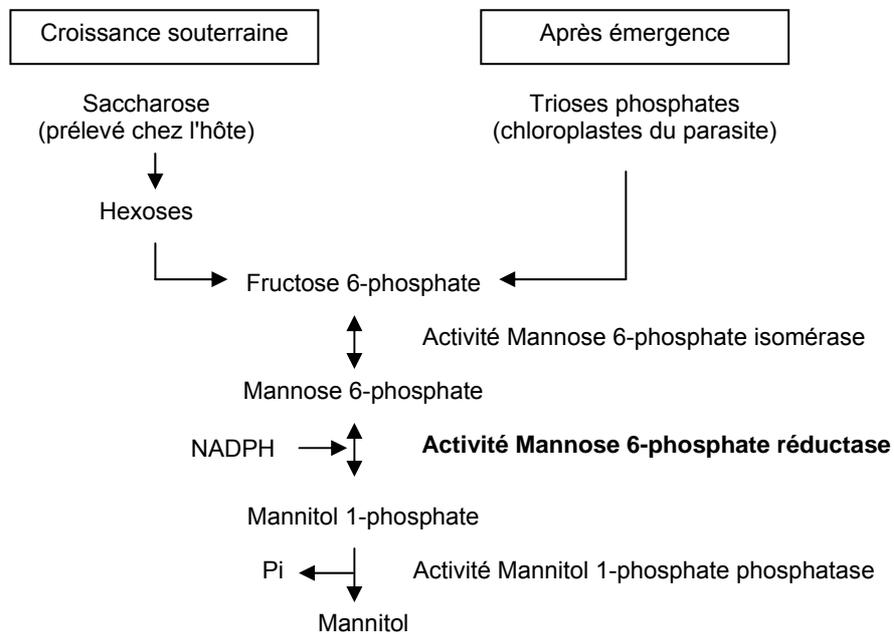
*al.*, 1984 ; Wegmann, 1986). Néanmoins, l'accumulation cytosolique du mannitol reste à démontrer.

#### 4 - Agent thermoprotecteur

*In vitro*, le mannitol améliore la stabilité à la chaleur de certaines enzymes extraites de *S. hermonthica* (Stewart *et al.*, 1984). Cet effet interviendrait *in vivo* lors de la croissance souterraine du parasite, le sol pouvant atteindre de fortes températures.

### B – Origine du mannitol chez *S. hermonthica*

Pendant la phase de développement souterrain, le mannitol est produit à partir d'hexoses phosphates issus de l'hydrolyse du saccharose prélevé chez l'hôte (Figure 14). Après émergence, la production de mannitol est principalement localisée dans les feuilles et s'effectue à partir des trioses phosphates produits par photosynthèse. Le mannitol est ainsi le principal produit photosynthétique (Pageau *et al.*, 1998).



**Figure 14** – Voie de production de mannitol chez *S. hermonthica*

## C - La M6PR chez les plantes autotrophes et parasites

### 1 – Rôle dans la biosynthèse du mannitol (Figure 14)

Chez le céleri (plante autotrophe) et l'Orobanche rameuse (holoparasite), la conversion du mannose 6-phosphate (M6P) en mannitol 1-phosphate (M1P) est catalysée par la mannose 6-phosphate-réductase NADPH dépendante (M6PR, EC 1.1.1.224, Rumpho *et al.*, 1983 ; Loescher *et al.*, 1992 ; Robert *et al.*, 1999a, Delavault *et al.*, 2002). Une protéine à activité M6PR a été détectée et partiellement caractérisée chez *S. hermonthica* (Robert, 1997; Robert *et al.*, 1999a). La M6PR, absente des principales plantes infestées, serait donc une cible intéressante pour lutter contre les plantes parasites productrices de mannitol. Des inhibiteurs spécifiques de la M6PR d'*Orobanche* ont été récemment identifiés (Robert *et al.*, 1999b; Rousset, 2003).

### 2 – Localisation - Caractéristiques physicochimiques

Des études immuno-histochimiques chez le céleri ont permis de localiser la M6PR dans le cytosol des cellules foliaires chlorophylliennes (Everard *et al.*, 1993 et 1994). La protéine a été purifiée à homogénéité chez cette espèce et présente des caractéristiques physico-chimiques similaires à celles déterminées pour l'enzyme semi-purifiée d'*O. ramosa* et de *S. hermonthica*, à l'exception d'une affinité moindre pour le M6P et le NADPH (Tableau 3, Loescher *et al.*, 1992 ; Everard *et al.*, 1997 ; Robert *et al.*, 1999a). Bien que non purifiée à 100%, la protéine à activité M6PR a été clairement détectée sur gel natif chez ces deux parasites (Robert *et al.*, 1999a). Par ailleurs, le gène *M6PR*, caractérisé chez l'Orobanche rameuse (Delavault *et al.*, 2002), présente une forte homologie avec celui du céleri (Everard *et al.*, 1997). Le poids moléculaire (PM) de la protéine déduite chez *O. ramosa* (35 kDa) est proche du PM de la protéine à activité M6PR détectée sur gel (38-39 kDa).

**Tableau 3** - Caractéristiques physico-chimiques de la M6PR

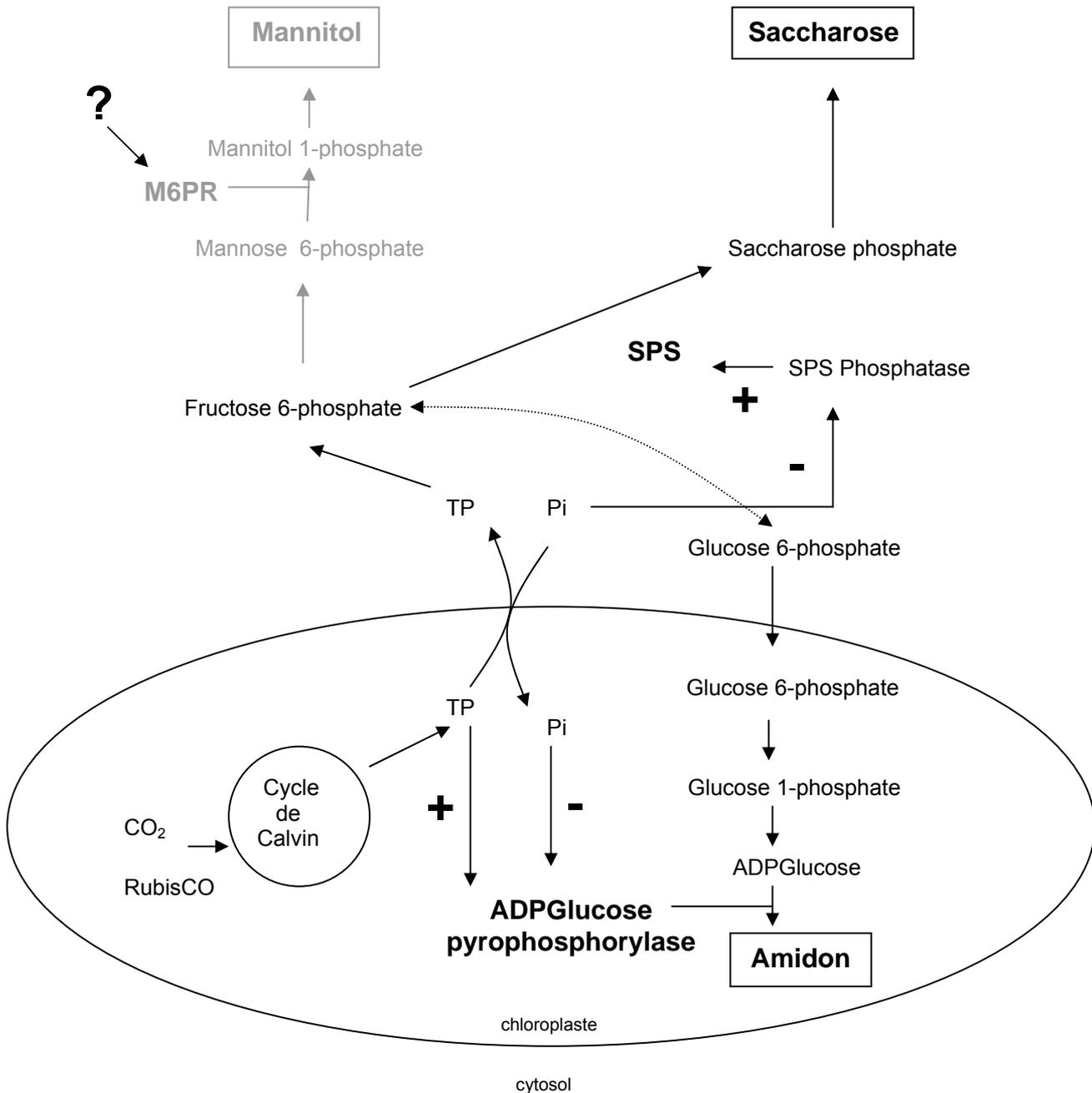
	Céleri fraction purifiée	O. rameuse fraction semi-purifiée	S. hermonthica fraction semi-purifiée
Poids moléculaire (kDa) (protéine dénaturée)	35	38-39	39
pH optimal	7.5	7.0	7.0
T°C optimale	35	45	35
$K_m$ M6P (mM)	15.8 ± 3	8.6 ± 1.2	5.9 ± 0.3
$K_m$ NADPH (µM)	169 ± 50	69.8 ± 14.9	10.2 ± 1.0

### 3 – Informations sur la régulation de l'activité M6PR

Chez le céleri, l'expression du gène *M6PR* est très faible dans les racines, les pétioles, les jeunes feuilles et les fleurs. Par contre, une surexpression du gène accompagnée d'une augmentation de l'activité M6PR est observée au cours du développement foliaire (Everard *et al.*, 1997). Chez cette espèce, l'activité M6PR est donc étroitement liée à la capacité photosynthétique des feuilles et joue ainsi un rôle majeur dans l'assimilation du carbone photosynthétique. Chez le parasite non photosynthétique *O. ramosa*, tous les organes, quel que soit leur stade de développement, présentent une activité M6PR relativement élevée. Un niveau d'expression constant est observé en parallèle dans ces organes pour le gène *M6PR* (Delavault *et al.*, 2002).

Chez les plantes typiquement productrices de saccharose et d'amidon, la répartition du carbone entre ces deux glucides est finement contrôlée par le biais d'une régulation post-traductionnelle de deux enzymes majeures : la saccharose phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14) impliquée dans la synthèse du saccharose dans le cytosol et l'ADP glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27) impliquée dans la synthèse de l'amidon dans les chloroplastes. La SPS est activée par déphosphorylation avec une SPS phosphatase (EC 3.1.3.24), elle-même activée par la lumière (Huber et Huber, 1992 et 1996) et

inhibée par le phosphate inorganique (Pi) cytosolique. En revanche, l'ADP glucose pyrophosphorylase est activée par les trioses phosphates (TP) issus du cycle de Calvin et inhibée par le Pi chloroplastique. Les échanges TP ↔ Pi entre le chloroplaste et le cytosol (navette) modulent la quantité de Pi et de TP disponible dans ces deux compartiments et favorisent ainsi la synthèse du saccharose ou de l'amidon (Figure 15, voies métaboliques en noir).



**Figure 15** – Régulation de la répartition du carbone chez les plantes productrices de saccharose et d'amidon (La voie métabolique en gris est spécifique des plantes productrices de mannitol)

Chez le céleri, une plante productrice de saccharose et de mannitol, la répartition du carbone photosynthétique entre ces deux glucides est équitable (Everard *et al.*, 1994). A l'image des plantes productrices de saccharose et d'amidon, il est peu probable que la production de mannitol soit contrôlée uniquement au niveau transcriptionnel chez cette espèce (Everard *et al.*, 1997). Everard *et al.* (1994) ont montré que l'activité M6PR des feuilles du céleri augmentait sensiblement en réponse à un stress salin sans qu'il y ait surexpression du gène. Ces travaux suggèrent une régulation post-traductionnelle de la M6PR, dont les mécanismes demeurent inconnus à ce jour.

# MATERIEL ET METHODES

## I - Matériel végétal

*S. hermonthica* (Del.) Benth a été récolté au Soudan (1995) dans des champs de sorgho infestés. Au laboratoire, le parasite est cultivé sur une variété sensible de sorgho (*Sorghum bicolor* L., var. SH4 Arval, *Poaceae*).

Pour le préconditionnement, les graines, mises directement en pot de culture (1 dm<sup>3</sup>) dans un mélange de terre et sable 50/50 (v/v), sont maintenues pendant une semaine à l'obscurité, à l'humidité et à 25°C. Après cette phase, l'hôte est semé à raison d'un caryopse par pot, puis cultivé à 20-25°C (jour-nuit) sous 13 heures de photopériode (300  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photosynthetically Active Radiation, PAR). Les cultures sont arrosées trois fois par semaine. Les feuilles du parasite sont prélevées au minimum quatre semaines après émergence.

Egalement récoltées au Soudan en 1995, les graines d'*O. ramosa* (*Orobanchaceae*) proviennent de champs de tomates. Au laboratoire, l'Orobanche rameuse est cultivée sur une variété sensible de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mil., var. Strain B, *Solanaceae*) dans les mêmes conditions que *S. hermonthica*. Les hampes florales sont récoltées trois semaines après émergence.

Des analyses ont été également réalisées sur des feuilles adultes de céleri branche acheté dans le commerce et d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia, *Brassicaceae*), cultivé en enceinte phytotronique (22°C, humidité relative 70%, photopériode de 16 heures sous 75  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR, un arrosage par semaine).

## II - Extraction des acides nucléiques

### A - Extraction des ADN totaux

Les ADN totaux sont extraits à partir de 300 mg de matière fraîche (MF) congelés dans l'azote liquide suivant le protocole du kit DNeasy Plant Mini Kit™ (Qiagen).

### B - Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits dans 3 mL de trizol (phénol et isothiocyanate de guanidine) à partir de 300 mg MF préalablement congelés et broyés dans l'azote liquide. Après incubation 5 minutes à température ambiante et centrifugation (12000 x g, 4°C pendant 15 minutes), 0.6 mL de chloroforme est ajouté au surnageant. Après incubation (3 minutes) et centrifugation, la phase supérieure incolore (aqueuse) contenant les ARN totaux est délicatement prélevée.

Les ARN totaux sont précipités par addition de 1.5 mL d'isopropanol. Après incubation 10 minutes à température ambiante puis centrifugation, le culot est lavé avec 3 mL d'éthanol 75% (v/v) refroidi à -20°C. Après centrifugation (7500 x g, 4°C pendant 5 minutes), le surnageant est éliminé et le culot séché à température ambiante. Les ARN totaux sont solubilisés dans 250 µL d'eau distillée stérile. Toute trace d'ADN est éliminée par un traitement à la DNase I.

L'efficacité de l'extraction et de la purification des ARN totaux est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et dosage spectrophotométrique ( $A_{260}$ , rendement de 13 µg g<sup>-1</sup> MF).

### C - Synthèse des ADNc et amplification de l'ADNc d'intérêt

#### 1 - Synthèse des ADNc

Les ADNc sont synthétisés à partir de 4 µg d'ARN totaux selon les instructions du kit GeneRacer Kit™ (Invitrogen), avec l'amorce GeneRacer™ Oligo-dT et l'enzyme Superscript™ II RT.

## 2 - Amplification de l'ADNc d'intérêt

### a - PCR

Plusieurs amorces M6PR dites "universelles" sont définies par alignement des séquences d'ADNc d'Orobanche rameuse et de céleri, et d'ORF (*Open reading frame*) d'*A. thaliana*, de blé et de riz. Une PCR avec les différents jeux d'amorces est réalisée sur les ADNc totaux de *S. hermonthica*.

Les amorces sens utilisées sont :

M6PR1 (5' – CTBAACARYGGCTTYAARATGCC - 3') T<sub>m</sub> 60.2°C

M6PR2 (5' – GTCTKGTNAAGAGRGAGGATCT - 3') T<sub>m</sub> 55.6°C

M6PR3 (5' – GARACHACWTGGCAYGMNATGGA - 3') T<sub>m</sub> 59.4°C

Les amorces anti-sens utilisées sont :

M6PR4 (5' – GGRTGTGTYTCRATYTGATTCAC - 3') T<sub>m</sub> 58.9°C

M6PR5 (5' – AGATNCCATRYTTCTGRCAGAA - 3') T<sub>m</sub> 59.2°C

M6PR6 (5' – GTGTTNCKCTGVABNCCCCA - 3') T<sub>m</sub> 59.0°C

(NB : B = G + T + C ; D = G + A + T ; H = A + T + C ; K = G + T ; M = A + C ; N = A + C + G + T ; R = A + G ; S = G + C ; V = G + A + C ; W = A + T ; Y = C + T)

Toutes les combinaisons d'amorces sont testées par PCR dans les conditions suivantes :

Tampon 10X (Promega)	10% (v/v)	95°C	3 min	35 cycles		
dNTP (Euromedex)	10 nmoles	95°C	30 sec			
Taq polymérase (Promega)	250 mU				54°C	45 sec
Amorce sens	20 pmoles				72°C	2 min
Amorce anti-sens	20 pmoles	72°C	7 min			
ADNc (dilution 1/3)	1 µL					
H <sub>2</sub> O	qsp 50 µL					

### b - Clonage, criblage et extraction du plasmide

La séquence amplifiée par PCR avec le jeu d'amorces M6PR2-M6PR6 est insérée dans un vecteur plasmidique (plasmide pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>) suivant le protocole du kit TOPO TA Cloning kit<sup>™</sup> (Invitrogen), lui-même transfecté dans une bactérie compétente (*E. coli* Génotype TOP10). Les bactéries sont mises en culture

à 37°C pendant une nuit sur milieu gélosé LB (Bacto-tryptone 10 g L<sup>-1</sup>, Bacto-yeast extract 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, Bacto-agar 15 g L<sup>-1</sup>) additionné de kanamycine (50 µg mL<sup>-1</sup>) et de X-Gal (40 µg mL<sup>-1</sup>).

L'insertion du plasmide dans les colonies blanches est vérifiée par PCR avec les amorces fournies par le kit TOPO TA Cloning kit<sup>TM</sup> (Invitrogen). Chaque colonie est également repiquée sur milieu gélosé LB – kanamycine.

La PCR est réalisée dans les conditions suivantes :

Tampon 10X (Promega)	10% (v/v)	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">95°C 10 min</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 5px;">95°C 1 min</div> <div style="margin-bottom: 5px;">50°C 1 min</div> <div style="margin-bottom: 5px;">72°C 2 min</div> </div> <div style="margin-left: 10px;">25 cycles</div> </div>
BSA	2% (v/v)	
dNTP (Euromedex)	5 nmoles	
Taq polymérase (Promega)	500 mU	
Amorce Reverse (Invitrogen)	2 pmoles	
Amorce Forward (Invitrogen)	2 pmoles	
H <sub>2</sub> O	qsp 25 µL	

Les colonies positives sont repiquées dans un milieu liquide LB additionné d'ampicilline (50 µg mL<sup>-1</sup>) et incubées une nuit à 37°C. Deux techniques d'extraction plasmidique ont dû être réalisées dans le cadre de ce travail.

Dans un premier temps, les plasmides sont extraits à partir de 3 x 10 mL de culture liquide d'après le protocole du kit QIAprep Spin Miniprep<sup>TM</sup> (Qiagen). L'extrait obtenu est appelé E1.

Une seconde extraction plasmidique est réalisée suivant le protocole du kit QIAGEN Plasmid Midi Kit<sup>TM</sup> (Qiagen) à partir de 25 mL de culture bactérienne. Le culot d'ADN plasmidique est repris dans l'extrait E1. L'échantillon est concentré au Speed Vac. Le plasmide est digéré par EcoRI dans les conditions suivantes :

Tampon EcoRI 10X (Biolabs)	10% (v/v)	2 heures à 37°C
EcoRI (Biolabs)	20 U	
ADN plasmidique	70 ng	
H <sub>2</sub> O	qsp 10 µL	

La présence de l'insert est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

## D - PCR sur ADN génomique

Une PCR est réalisée sur l'ADN génomique d'*A. thaliana*, de céleri, d'Orobanche rameuse et de *S. hermonthica*, avec les jeux d'amorces 2-4, 2-6, 3-4 et 3-5, dans les conditions suivantes :

Tampon II (Mg <sup>2+</sup> plus) 10X (TaKaRa)	10% (v/v)	95°C	3 min	
dNTP (TaKaRa)	10 nmoles			
LA Taq (TaKaRa)	1.25 U	95°C	30 sec	35 cycles
Amorce sens	10 pmoles	52°C	45 sec	
Amorce anti-sens	10 pmoles	72°C	2 min	
ADN	30 à 70 ng			
H <sub>2</sub> O	qsp 25 µL	72°C	7 min	

## III - Extraction et purification de la M6PR

### A - Extraction

Les feuilles (*Striga*, céleri, sorgho) et les hampes florales (*Orobanche*) (1g MF) sont broyées à l'ultra-turrax à 4°C dans 0.5 g de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et 5 mL de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM β-mercaptoéthanol) additionné de 33 µL d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma, P 9599). Le broyat est filtré sur gaze, centrifugé à 12000 x g pendant 10 minutes à 4°C, puis dessalé sur colonne PD-10 (Sigma) équilibrée avec 20 mL de tampon d'extraction. Les protéines sont quantifiées selon la technique de Bradford (1976).

### B - Mesure de l'activité M6PR dans les extraits dessalés

L'activité enzymatique optimale de *Striga* est mesurée à 35°C par spectrophotométrie (A<sub>340</sub>, Robert *et al.*, 1999a). Le milieu réactionnel (cuve essai, 1 mL) est composé de 31 mM Tris-HCl pH 7.0, de 5 mM MgCl<sub>2</sub>, de 0.3 mM NADPH et de 50 mM M6P (sel de potassium). La réaction est initiée par ajout de l'extrait dessalé (100 µg de protéines). Une cuve témoin ne contenant pas de M6P est réalisée en parallèle.

## C - Purification de la M6PR

Deux techniques de purification sont testées : l'immunoprécipitation et la chromatographie d'affinité, après fractionnement séquentiel des protéines.

### 1 - Fractionnement des protéines

Les extraits non dessalés de *S. hermonthica*, de sorgho et de céleri sont saturés dans un premier temps à 50% par ajout de sulfate d'ammonium ( $291 \text{ g L}^{-1}$ ) et incubés à  $4^\circ\text{C}$  sous agitation lente pendant 1 heure. Le culot, récupéré après centrifugation à  $12000 \times \text{g}$ , pendant 20 min à  $4^\circ\text{C}$ , est éliminé. Le surnageant est ensuite saturé à 70% par ajout de sulfate d'ammonium ( $125 \text{ g L}^{-1}$ ) et incubé à  $4^\circ\text{C}$  sous agitation lente pendant 1 heure. Le culot est repris dans 2.5 mL de tampon d'extraction puis dessalé sur colonne PD-10.

Les extraits d'*O. ramosa* contiennent nettement moins de protéines. La M6PR est donc récupérée dans la fraction globale 0-70% de saturation.

### 2 - Immunoprécipitation

Les immunoprécipitations sont réalisées suivant le protocole du kit Protein G Immunoprecipitation Kit<sup>®</sup> (Sigma). Un milligramme de protéines (fractions 50-70% ou 0-70%) est incubé avec 5  $\mu\text{g}$  d'anticorps anti-M6PR recombinante (IgG lapin anti-M6PR). Les fractions immunoprécipitées sont analysées en SDS PAGE.

\* Ces anticorps ont été obtenus par immunisation de lapins avec une M6PR recombinante produite par expression hétérologue du gène *M6PR* d'*O. ramosa* (Bioatlantic, 2000).

### 3 - Chromatographie d'affinité

Le gel d'affinité Reactive Yellow 86 - agarose (Sigma, R 8504) est couramment utilisé pour la purification d'oxydoréductases NAD(P)H dépendantes. Il a ainsi permis la purification à homogénéité de la M6PR du céleri (Everard *et al.*, 1994). Le gel (10 mL, 10 x 1cm) est équilibré avec 30 mL de tampon d'affinité (20 mM MES-KOH pH 6.5, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  et 1 mM DTT). Dix milligrammes de protéines (fraction 50-70% ou 0-70%) sont déposés sur la colonne. Les protéines non affines sont éliminées avec 40 mL de tampon d'affinité. La M6PR est ensuite éluée avec 10

mL de tampon additionné de NADPH 0.1 mM. L'éluat est dessalé sur colonne PD-10 équilibrée avec de l'eau distillée, puis lyophilisé et repris dans un volume minimal de tampon de Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glycérol, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0.002% (p/v) bleu de bromophénol).

## IV – SDS PAGE, immunoblot et microséquençage

### A – SDS PAGE

Les différents extraits protéiques sont analysés par électrophorèse monodimensionnelle (1D) (Protean II<sup>TM</sup>, Bio-Rad) sur gel d'acrylamide 12% en condition dénaturante (Laemmli, 1970).

	Gel de concentration 4%	Gel de séparation 12%
Eau distillée	9.8 mL	10 mL
Tris-HCl pH 6.8 (gel 4%), pH 8.8 (gel 12%)	4 mL	8 mL
Acrylamide, Bisacrylamide 30% (29:1)	2.2 mL	12 mL
	Dégazage 10 min sous vide	
SDS 10%	160 $\mu$ L	320 $\mu$ L
APS 10%	80 $\mu$ L	160 $\mu$ L
Temed	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

Les protéines dissoutes dans le tampon de Laemmli (40  $\mu$ g pour les fractions 50-70% et 0-70%\*) sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. L'électrophorèse est maintenue 2 heures à 120V dans du tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% (p/v) SDS).

\* Les protéines ne sont pas quantifiables dans les fractions obtenues après immunoprécipitation ou chromatographie d'affinité.

Les protéines sont rapidement colorées dans une solution de bleu de Coomassie R250 (0.25% (p/v) Coomassie Brilliant Blue, 90% (v/v) méthanol, 10% eau distillée) pendant 2 heures sous agitation. Les gels sont lavés dans une solution de décoloration (60% eau distillée, 30% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique, 12 heures).

## **B - Immunoblot**

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL™ Nitrocellulose membrane, Amersham ; Mini Trans Blot Transfer Cell, Biorad) pendant 1 heure à 200 mA dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% (p/v) SDS, 20% (v/v) méthanol).

Après blocage dans le tampon 50 mM Tris-HCl pH 7.5 contenant 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (v/v) et 5% (p/v) de lait écrémé (1 heure ou overnight), la membrane est incubée 3 heures à 30°C dans 25 mL de tampon TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20 et 1% (p/v) lait écrémé) contenant les anticorps anti-M6PR (IgG lapins cf. III.C.2) en proportion 1/2500 (v/v).

Après rinçage 3 fois 10 minutes dans du TBST, la membrane est incubée 1 heure à 30°C dans 25 mL de tampon TBST contenant les anticorps secondaires (Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc) en proportion 1/12500 (v/v). La membrane est ensuite rincée 2 fois 5 minutes dans du TBST puis 5 minutes dans du TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl). La M6PR est détectée par chimioluminescence suivant le protocole du kit ECL Plus™ Western Blotting (Amersham) avec des films X-Omat AR™ (Kodak).

## **C - Microséquençage du spot d'intérêt chez *S. hermonthica***

### 1 - Coloration des protéines au Bleu de Coomassie colloïdal, prélèvement et traitement du spot d'intérêt

Cette technique de coloration des gels SDS PAGE est utilisée en vue d'un séquençage protéique (Neuhoff *et al.*, 1988). Après électrophorèse de la fraction purifiée de *Striga* (cf. IV.A), les protéines sont fixées pendant 2 fois 1 heure dans un mélange 50% (v/v) éthanol - 2% (v/v) acide phosphorique, puis le gel est lavé 1 heure dans un bain d'acide phosphorique 2% (v/v). Les protéines sont sensibilisées à la coloration par une incubation de 20 minutes dans un mélange 17% (v/v) éthanol -

15% (p/v) sulfate d'ammonium - 2% (v/v) acide phosphorique, puis colorées pendant 1 à 3 jours dans ce même mélange additionné de Bleu de Coomassie G250 à 0.1% (p/v). Le gel est rincé 2 fois 10 minutes dans de l'eau distillée, 10 minutes dans un bain d'éthanol à 20% (v/v) puis stocké dans de l'eau distillée.

Après coloration, la bande de 39 kDa, présentant une activité M6PR *in situ* (Robert *et al.*, 1999a), est prélevée puis traitée au DTT et à l'iodoacétamide pour réduire et alkyler respectivement les résidus cystéines (Mann *et al.*, 2001). Cette étape permet de supprimer et d'éviter la reformation de ponts disulfures qui gênent la protéolyse enzymatique.

## 2 - Identification des protéines par LC-MS/MS (Prestation INRA de Nantes)

### *a - Analyse*

Les protéines sont digérées par la trypsine porcine (30  $\mu\text{L}$  à 15  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ , dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM) qui clive après les résidus lysine et arginine, sauf s'ils sont suivis d'un résidu proline. Les fragments de protéolyse sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse ( $\text{C}_{18}$ , diamètre interne 75  $\mu\text{m}$ , nano-débit de 200  $\text{nL min}^{-1}$ , équipement Ultimate, LC Packings / Dionex), puis analysés individuellement par spectrométrie de masse (Q-TOF Global, WATERS). Les plus abondants sont sélectionnés dans une cellule de collision pour être fragmentés : la mesure de masse des fragments permet alors de déterminer des éléments de la séquence en acides aminés du peptide.

### *b - Identification des peptides*

Les informations de masse et de séquence partielle obtenues sur l'ensemble des peptides élués sont soumises à une interrogation dans une banque de séquences protéiques (Swiss-Prot/TrEMBL).

## V - Analyse de l'activité Cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD)

### A - Extraction et mesure de l'activité CAD

L'activité CAD est extraite des feuilles de *Striga* dans le tampon d'extraction de la M6PR (cf. III.A., ratio 1/5 p/v) et mesurée par spectrophotométrie ( $A_{340}$ ) dans les fractions brute, 50-70% de saturation et semi-purifiée par chromatographie d'affinité sur gel d'agarose-RY86, selon un protocole adapté à partir de ceux décrits par Hawkins et Boudet (1994) et Mitchell *et al.* (1994). Le milieu réactionnel (1 mL) est composé de 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.5 à 7.5 mM d'alcool coniférylique (coniféryl alcool) et 2 à 100 µg de protéines.

### B - Molécules inhibitrices de la CAD et de la M6PR

Des expériences de compétition de substrats entre la CAD et la protéine à activité M6PR sont menées à partir des extraits bruts en mesurant d'une part l'activité CAD en présence de M6P 1 à 30 mM, et d'autre part l'activité M6PR en présence d'alcool coniférylique 0.25 à 5 mM. L'influence du diphényl phosphate (DPP) 1 à 15 mM, un inhibiteur spécifique de la M6PR d'*Orobancha ramosa* et de *Striga hermonthica* (Rousset, 2003), est également déterminée sur l'activité CAD.

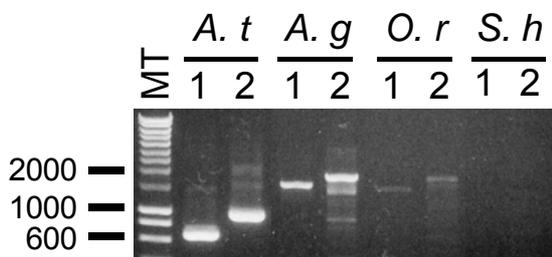
# RESULTATS

## I - Recherche de la séquence *M6PR* chez *S. hermonthica*

### A - Approche moléculaire

Récemment encore, seules deux séquences d'ADNc *M6PR* étaient référencées, celles du céleri et de l'Orobanche rameuse. Les séquences génomiques sont de nos jours encore inconnues chez ces deux espèces. Ces séquences d'ADNc présentent une forte homologie (Delavault *et al.*, 2002) et ont permis de générer des jeux d'amorces adaptés à l'amplification d'un ADNc *M6PR* chez ces deux plantes. Néanmoins, l'exploitation de ces amorces fut vaine à partir de l'ADNc de *S. hermonthica* (Devouge, 2003). Des séquences d'ORF *M6PR* d'*A. thaliana*, de blé et de riz ont été récemment référencées et ont permis de générer de nouveaux jeux d'amorces potentiellement utilisables pour amplifier le gène *M6PR* chez ces différentes espèces.

Dans un premier temps, l'amplification est réalisée par PCR sur l'ADN génomique d'*A. thaliana*, du céleri, de l'Orobanche rameuse et de *Striga*. Les quatre combinaisons d'amorces testées (2-4, 2-6, 3-4 et 3-5) permettent une amplification chez les trois premières espèces mais aucune n'est efficace sur l'ADN de *Striga*. La Figure 4 présente les amplifications obtenues avec les jeux d'amorces 2-4 et 2-6. Ces résultats sont validés par le fait que les séquences amplifiées chez *A. thaliana* (deux gènes *M6PR* putatifs) sont de taille attendue (amorces 2-4 : fragments de 670-690 pb ; amorces 2-6 : fragments de 960-980 pb). Les séquences amplifiées chez le céleri et l'Orobanche sont de taille identique mais se révèlent de taille supérieure à celles d'*Arabidopsis*.



**Figure 16** – Amplification par PCR des gènes *M6PR* sur l'ADN d'*Arabidopsis thaliana* (*A. t*), *Apium graveolens* (*A. g*), *O. ramosa* (*O. r*) et *S. hermonthica* (*S. h*) à l'aide des amorces 2-4 (1) et 2-6 (2). MT, marqueur de taille (pb).

Bien que peu probable, l'hypothèse de séquences introniques importantes chez *Striga* peut être émise pour expliquer l'absence d'amplification chez cette espèce. Pour valider ou non cette hypothèse, les mêmes jeux d'amorces sont testés sur l'ADNc de *Striga*. Seul le jeu d'amorces 2-6 aboutit à une amplification : un produit de 580 pb, taille attendue sur l'ADNc d'*A. thaliana*, est ainsi amplifié, puis cloné. Une croissance bactérienne limitée ainsi qu'un rendement d'extraction plasmidique très faible ont compliqué le séquençage de ce fragment d'ADNc. Ce dernier présente une forte homologie (86%) avec un fragment de l'ADNc d'une protéase à cystéine d'*A. thaliana* (n° d'accèsion BT000676), et non pour une séquence *M6PR*.

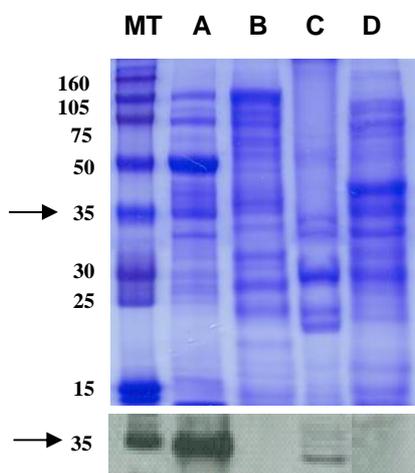
En dernier lieu, une 3' RACE est réalisée sur l'ADNc de *Striga* avec un oligodT et trois amorces différentes (M6PR1, M6PR2, M6PR3) afin d'augmenter les chances d'amplification. Aucune amplification n'est obtenue.

## B - Approche biochimique

L'objectif est d'isoler la protéine à activité M6PR de *Striga* et de la séquencer partiellement.

### 1 - Analyse SDS PAGE, immunoblot et révélation ECL

Par une technique décrite par Loescher *et al.* (1994) et Robert *et al.* (1999a), l'activité M6PR des feuilles de *Striga* et du céleri pris en référence (témoin positif), est préalablement confinée dans la fraction 50-70% de saturation en sulfate d'ammonium. Celle de l'Orobanche rameuse est concentrée dans la fraction 0-70%. La fraction 50-70% des feuilles du sorgho ne présente pas d'activité M6PR, elle est également prise en référence dans cette étude (témoin négatif).



**Figure 17** – Analyses SDS PAGE des fractions semi-purifiées.

#### Coloration au bleu de Coomassie

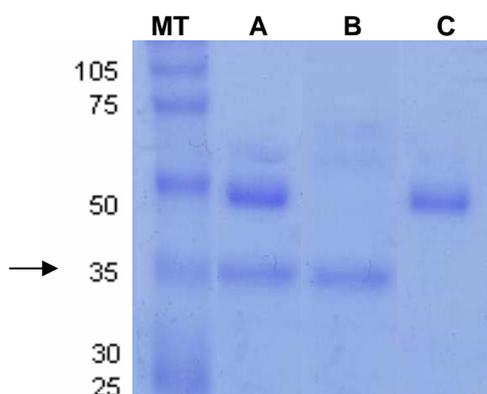
MT - Marqueurs de taille (Full Range Rainbow™ 150 µg mL<sup>-1</sup>, Amersham) ; A - fraction 50-70% de céleri (40 µg) ; B - fraction 50-70% de sorgho (40 µg) ; C - fraction 0-70% d'Orobanche rameuse (40 µg) ; D - fraction 50-70% de *Striga* (40 µg)

#### Immunoblot

(anticorps anti-M6PR recombinante) et détection ECL

D'après Loescher *et al.* (1994) et Robert *et al.* (1999a), la M6PR du céleri et de l'Orobanche rameuse a un poids moléculaire de 35-39 kDa (cf. flèche sur Figure 17). Une activité M6PR a été également associée à une protéine de PM similaire chez *S. hermonthica* (Robert *et al.*, 1999a). Un immunoblot avec les anticorps anti-M6PR recombinante montre que ces derniers reconnaissent la M6PR du céleri ainsi que celle de l'Orobanche rameuse (Figure 17). La quantité de M6PR dans la fraction protéique du céleri est néanmoins nettement supérieure. Les anticorps ne reconnaissent aucune protéine dans les extraits de sorgho, ce qui confirme l'absence de la M6PR chez cette espèce non productrice de mannitol. Aucune fixation n'est également visible dans les extraits protéiques de *Striga*, et ce même en augmentant le taux d'anticorps primaires à 1/100 ou la quantité de protéines déposées à 80 µg (résultats non présentés).

Au même titre que les travaux moléculaires présentés préalablement, ces résultats suggèrent l'existence d'une protéine à activité M6PR chez le parasite *Striga* qui se différencie nettement de la M6PR d'autres plantes productrices de mannitol, telles que le céleri et l'Orobanche rameuse. Les anticorps anti-M6PR produits au laboratoire reconnaissent la M6PR de ces espèces, mais s'avèrent indifférents à la protéine de *Striga*. Ces résultats expliquent par ailleurs les résultats négatifs obtenus antérieurement (en début de stage) dans l'exploitation de ces anticorps pour des tests d'immunoprécipitation. Ces immunoprécipitations avaient été réalisées à partir des fractions semi-purifiées d'*Orobanche* et de *Striga* (Figure 18).

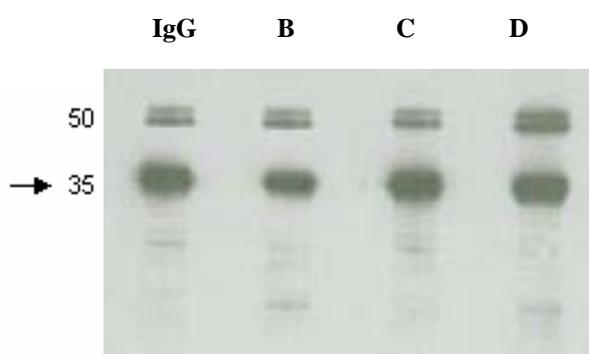


**Figure 18** – Analyse SDS PAGE des fractions immunoprécipitées. MT - marqueurs de taille ; A - extrait immunoprécipité à partir de la fraction 0-70% d'*O. ramosa* ; B - M6PR purifiée d'*O. ramosa* (Robert *et al.*, 1999a) ; C - Extrait immunoprécipité à partir de la fraction 50-70% de *Striga*.

Une bande de PM proche de celui de la M6PR (puits A et B) est visible dans la fraction immunoprécipitée d'*Orobanche*. Ce résultat atteste de l'efficacité de ces anticorps pour l'immunoprécipitation de la M6PR d'*Orobanche*. Les bandes

observées à des PM voisins de 50 kDa correspondent aux chaînes lourdes des anticorps libérés des billes d'agarose par le traitement au mercaptoéthanol ou au DTT. Seules ces chaînes lourdes d'anticorps sont observées dans la fraction immunoprécipitée de *Striga* (puits C), aucune bande au voisinage de 35 kDa n'est par ailleurs visible après coloration au bleu de Coomassie.

Un immunoblot avec les anticorps de lapin anti-M6PR recombinante, suivi d'une révélation par ECL, a été réalisé (Kit ECL plus, Amersham Biosciences, Figure19).

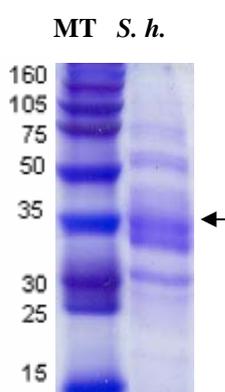


**Figure 19** – Immunoblot et révélation ECL des fractions immunoprécipitées.  
 IgG - Anticorps anti-M6PR recombinante (1µg)  
 B - Extrait immunoprécipité de la fraction 50-70% de sorgho ; C - Extrait immunoprécipité de la fraction 0-70% d'*O. ramosa* ; D - Extrait immunoprécipité de la fraction 50-70% de *Striga*.

Dans tous les extraits testés (puits B, C, D), y compris dans celui du sorgho, deux bandes proches de 50 kDa sont visibles ainsi qu'une bande très réactive de l'ordre de 35 kDa. Comme le montre le puits A, ces bandes correspondent respectivement aux chaînes lourdes et légères des IgGs de lapin anti-M6PR greffés au billes d'agarose pour l'immunoprécipitation. Ces chaînes sont libérées des billes d'agarose au cours de la dernière étape de la procédure d'immunoprécipitation (décrochage de la M6PR par un traitement au mercaptoéthanol ou au DTT). Les chaînes légères ont un PM voisin de celui de la M6PR et leur forte réactivité vis-à-vis des anticorps secondaires utilisés pour la révélation ECL (Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)) se superpose à celle de la M6PR dans les extraits d'*Orobanche*. Cette "réactivité parasite" s'oppose ainsi à la visualisation de toute protéine au voisinage de 35 kDa ; elle aurait pu être évitée à l'aide d'anticorps secondaires spécifiquement ciblés sur les chaînes lourdes des IgGs de lapin. Au vu du résultat des autres travaux menés en parallèle (Figure 17) qui souligne l'originalité de la protéine de *Striga*, l'idée de purifier cette protéine par immunoprécipitation avec des anticorps anti-M6PR a été logiquement abandonnée.

## 2 - Purification partielle de la protéine d'intérêt et microséquençage

Après obtention de la fraction 50-70% de saturation en sulfate d'ammonium et chromatographie d'affinité sur agarose-RY86 d'après la méthode décrite par Robert *et al.* (1999a), la fraction protéique ainsi enrichie en protéine d'intérêt est visualisée en SDS PAGE (Figure 20). Un doublet au voisinage de 35 kDa est observé, l'activité M6PR a été par ailleurs localisée par Robert *et al.* (1999a) au niveau de la bande de plus haut poids moléculaire (cf. flèche sur Figure 20).



**Figure 20** – SDS PAGE de la fraction enrichie de la protéine d'intérêt de *Striga*  
MT – Marqueur de taille ; *S.h.* – *S. hermonthica*

NB : Un immunoblot confirme une fois de plus la non reconnaissance de la protéine d'intérêt par les anticorps anti-M6PR recombinante (résultat non présenté).

La bande de plus haut PM de ce doublet est prélevée en vue d'une digestion trypsique et d'un microséquençage par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) des peptides majeurs libérés. Trente cinq peptides sont ainsi analysés dont vingt quatre correspondent à des séquences protéiques connues ou putatives (Tableau 4). Néanmoins, aucun des peptides analysés ne correspond à une séquence de la M6PR de céleri ou d'Orobanche rameuse. Au moins quatre protéines composent la bande prélevée sur le gel 1D : une cinnamyl alcool déshydrogénase (10 peptides), une malate déshydrogénase (10 peptides), une glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (2 peptides) et une quinone oxydoréductase (2 peptides).

**Tableau 4** - Propriétés des peptides analysés par LC-MS/MS

CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase ; MDH : malate déshydrogénase ; G3P DH : Glycéraldéhyde 3-P déshydrogénase ; Qox : quinone oxydoréductase ; ... : incertitude sur l'acide aminé.

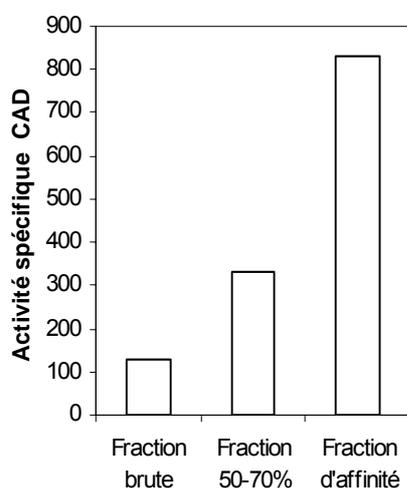
Séquence	M/z	PM	Protéine identifiée
(R) DSSGVLSPFNFSR (R) méthyl D(1)	713.836	1425.656	Q9ATW1 CAD (fraise)
(R) FVIDIGNTLK (A)	560.313	1118.61	Q9ATW1 CAD (fraise)
(K) DVALAHILAYEVPSANGR (Y) Amide C ter	947.943	1893.87	Q8S0X2 CAD (riz)
... ALAHLAFENPSANGR	632.299	1893.874	CAD putative ( <i>A. thaliana</i> )
LLAFENPSANGR	644.825	1287.634	CAD putative ( <i>A. thaliana</i> )
... AELLDPALK	655.301	1308.586	CAD putative ( <i>A. thaliana</i> )
... YPELPLPTK	650.31	1298.604	CAD putative ( <i>A. thaliana</i> )
VVLTSSLAS ...TPR	904.964	1807.912	CAD putative ( <i>A. thaliana</i> )
... GLDFLPVD ...	751.378	1500.74	CAD putative ( <i>A. thaliana</i> )
QTEHLSLPG ...	437.902	1310.683	CAD putative ( <i>A. thaliana</i> )
(K) LASGEVFGPNQPIALK (L)	820.95	1639.884	O48902MDH (luzerne)
(K) VAILGAAGGIGQPLSLLMK (L) oxydation M (18)	913.024	1824.032	O48904 MDH (luzerne)
(R) LFGVTTLDVVR (A)	610.322	1218.6281	O48904 MDH (luzerne)
(R) SSAASTAVSIVDAIR (S)	724.384	1446.752	P15719 MDH (maïs)
(R) VLVGTGAAGQIGYALVPMIAR (G) oxydation M (17)	1008.563	2015.11	Q08062 MDH (maïs)
(K) MELVDAAFPLK (G)	673.851	1345.686	Q08062 MDH (maïs)
(K) MELVDAAFPLK (G) oxydation M (1)	681.844	1361.672	Q08062 MDH (maïs)
(K) VLVVANPANTNALILK (E)	825.427	1648.838	Q08062 MDH (maïs)
(K) NVIIWGNHSSSQYPDVNHATVK (T)méthyl CDEHKNRQ (8)	827.386	2479.135	Q08062 MDH (maïs)
(K) LDLTAEELSEEK (N) amidation C-ter	688.33	1374.644	Q9FT00 MDH (pois chiche)
(R) AAALNIVPTSTGAAK (A)	692.887	1383.758	P09043 G3P DH (tabac)
(K) TFAEEVNAAFR (D)	627.79	1253.564	P09043 G3P DH (tabac)
(K) EGDEVYGDINDK (G)	677.27	1352.524	Q94F67 Qox (tournesol)
... VEDLAQGLESQPR	874.42	1746.824	Qox putative
...NVLQ...	565.283	1128.55	Néant
... EMLD...	640.805	1279.594	Néant
...GLPV...	660.668	1978.981	Néant
...VYGD...	677.27	1352.524	Néant
...VTVPELQD...	680.698	2039.71	Néant
...LTLNA...	711.39	2131.147	Néant
VAHYS...	723.866	1445.716	Néant
[DL/NN] ATAFVNVL...	745.877	1489.738	Néant
VVLVGA... PAT...	747.428	2239.261	Néant
...DPNLYSP...	880.393	1758.77	Néant
...AAGATA...	926.499	1850.982	Néant

## C - Etude de l'activité Cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD)

### 1 - Mesure de l'activité CAD

Notre intérêt se porte sur la protéine cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) qui catalyse la réduction de l'aldéhyde coniférylique en alcool coniférylique en présence de NADPH. Cette activité est néanmoins réversible et a été quantifiée dans cette étude dans le sens de l'oxydation de l'alcool coniférylique en présence de NADP<sup>+</sup>.

L'activité CAD est mesurée dans les différentes fractions récoltées au cours de la purification de la M6PR : extrait brut, fraction 50-70% de saturation au sulfate d'ammonium et fraction obtenue par chromatographie d'affinité (Figure 21).



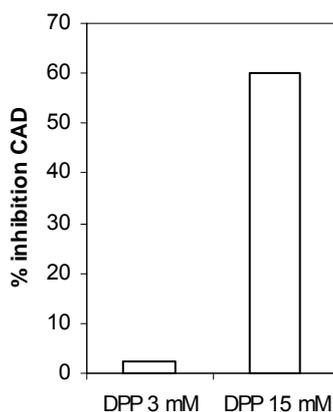
**Figure 21** - Activité spécifique CAD (nmol minute<sup>-1</sup> mg de protéines<sup>-1</sup>) des fractions protéiques brute et semi-purifiées de *Striga* (Résultats types)

L'activité CAD optimale est mesurée en présence d'alcool coniférylique 5 mM et de NADP<sup>+</sup> 2 mM.

Ces résultats montrent que la purification de la M6PR aboutit à un enrichissement des extraits en activité CAD. Celle-ci est nettement supérieure à l'activité M6PR et le ratio des activités M6PR / CAD passe ainsi de 1/20 dans l'extrait brut à 1/100 dans la fraction d'affinité. Il est par ailleurs fréquent d'observer une inactivation de la M6PR après chromatographie d'affinité alors que l'activité CAD est conservée dans ces extraits.

## 2 - Tests d'inhibition de la CAD et de la M6PR

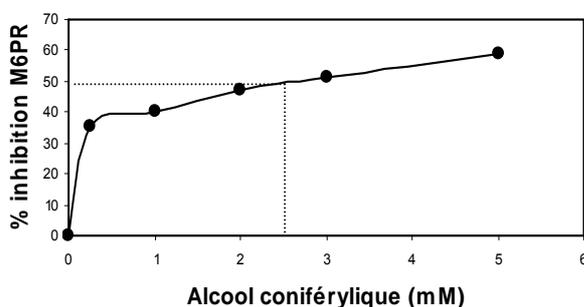
Le pouvoir inhibiteur du diphenyl phosphate (DPP), molécule inhibitrice de la M6PR (Rousset, 2003), est testé sur l'activité CAD. Celle-ci est diminuée de 60% en présence de DPP 15 mM (Figure 22). L'activité CAD est mesurée également en présence de concentrations croissantes en M6P (1 à 30 mM). Aucun effet inhibiteur du M6P n'est observé sur l'activité CAD.



**Figure 22** - Pouvoir inhibiteur du DPP sur l'activité CAD

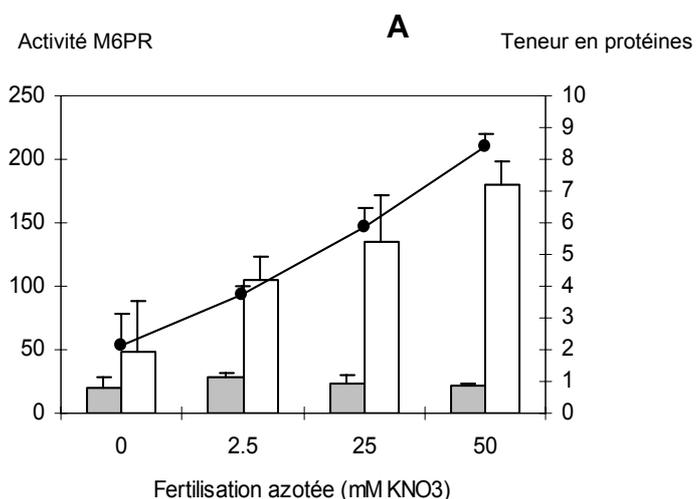
L'activité CAD est mesurée à 35°C en présence d'alcool coniférylique 5 mM, de NADP<sup>+</sup> 2 mM, et de DPP 3 ou 15 mM. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport à l'activité optimale (sans DPP).

A l'opposé, l'effet de concentrations croissantes d'alcool coniférylique (0.25 à 5 mM), est testé sur l'activité M6PR (Figure 23). L'alcool coniférylique exerce un effet inhibiteur sur la M6PR avec une IC<sub>50</sub> voisine de 2.5 mM (pour 25 mM de M6P).

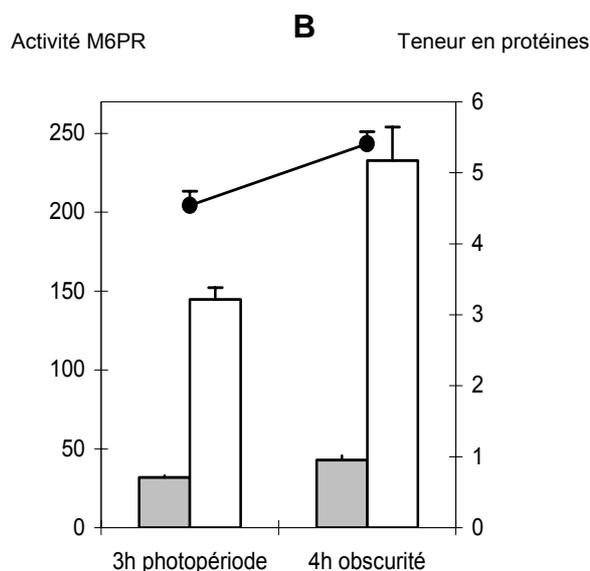


**Figure 23** - Pouvoir inhibiteur de l'alcool coniférylique sur l'activité M6PR (résultats types)

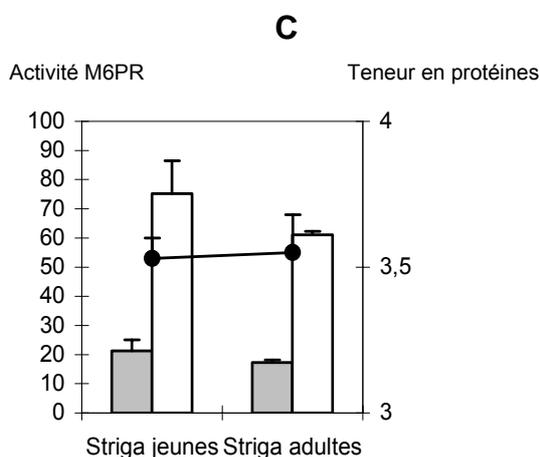
L'activité M6PR est mesurée à 35°C en présence de M6P 25 mM, de NADPH 0.3 mM, et d'alcool coniférylique 0.25 à 5 mM. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport à l'activité optimale (sans alcool coniférylique).



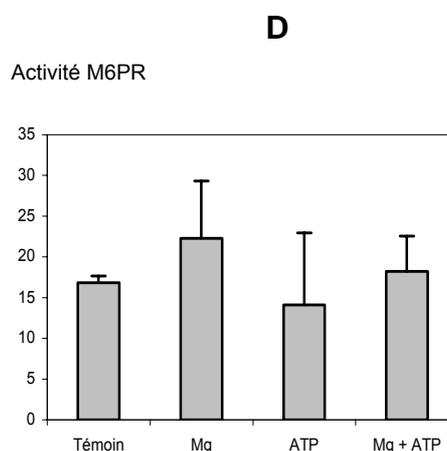
Les mesures sont réalisées à partir de feuilles adultes récoltées à la troisième heure de la photopériode (n=4)



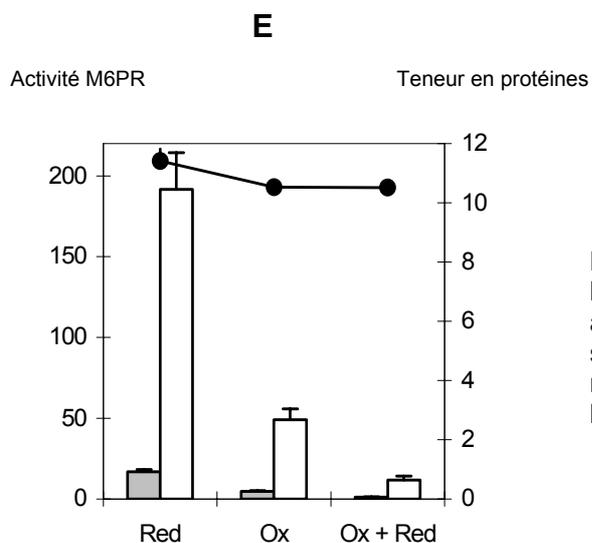
Les mesures sont réalisées à partir de feuilles récoltées sur des plants cultivés sous 2.5 mM KNO<sub>3</sub> (n=3)



Les mesures sont réalisées à partir des feuilles les plus développées de plants cultivés sous 2.5 mM KNO<sub>3</sub> récoltées à la troisième heure de la photopériode (n=3)

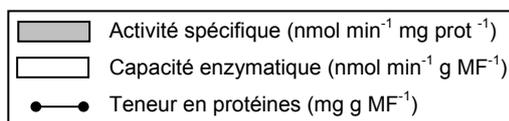


Les mesures sont réalisées à partir de feuilles adultes récoltées à la troisième heure de la photopériode. Le milieu réactionnel contient 2 mM ATP et/ou 5 mM MgCl<sub>2</sub> (n=3)



Les mesures sont réalisées à partir de feuilles récoltées sur des plants cultivés sous 50 mM KNO<sub>3</sub> ; Red : extraction avec mercaptoéthanol ; Ox : extraction sans mercaptoéthanol ; Ox + Red : extraction sans mercaptoéthanol puis ajout de mercaptoéthanol dans le milieu réactionnel (n=2).

**Figure 24** – Détermination des facteurs de régulation de l'activité M6PR. A – Influence de l'approvisionnement en azote ; B – Influence de l'éclairage ; C – Influence du stade de développement du parasite ; D – Influence du magnésium et de l'ATP ; E – Influence de l'environnement redox au cours de l'extraction.



## II - Recherche de facteurs régulant l'activité M6PR chez *S. hermonthica*

L'objectif est de mettre en évidence des facteurs de régulation de l'activité M6PR chez *S. hermonthica*. Pour cela, plusieurs paramètres sont testés : des paramètres environnementaux tels que l'approvisionnement en azote et l'éclairement, et un paramètre endogène, le stade de développement du parasite. L'effet du magnésium, de l'ATP et de l'environnement redox est aussi testé sur l'enzyme extraite.

La fertilisation azotée entraîne une nette augmentation du pool de protéines et de la capacité enzymatique M6PR. L'activité spécifique M6PR reste quant à elle constante (Figure 24-A). Des plants cultivés sous 2.5 mM de nitrate sont placés, à la troisième heure de photopériode, à l'obscurité pendant quatre heures. Cette exposition induit également l'accroissement du taux de protéines et de la capacité enzymatique M6PR (Figure 24-B). L'activité spécifique serait aussi augmentée.

L'activité M6PR est mesurée dans les feuilles les plus développées de *Striga* jeunes (sept à dix jours après émergence) et adultes (un mois et demi à deux mois après émergence). Ces feuilles présentent un taux de protéines et une capacité enzymatique équivalents (Figure 24-C).

La présence d'ATP et/ou de magnésium (Mg) dans le milieu réactionnel influence notablement l'activité d'enzymes régulées par phosphorylation (Huber et Huber, 1992 et 1996 ; Kaiser et Huber, 1994). Par contre, ces composés n'influent pas sur l'activité M6PR de *Striga* (Figure 24-D). Une observation similaire a été faite dans le cadre de cette étude pour l'activité M6PR de l'Orobanche rameuse et du céleri (résultats non figurés).

Enfin, l'influence de l'environnement redox sur l'activité M6PR de *Striga* est définie (Figure 24-E). L'omission de mercaptoéthanol dans le tampon d'extraction n'influe pas sur le taux de protéines extraites, mais conduit à une diminution d'un facteur quatre de l'activité M6PR. Cette inhibition enzymatique n'est pas réversée par l'ajout de mercaptoéthanol dans le milieu réactionnel.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Contrairement à leurs hôtes, de nombreuses plantes parasites synthétisent et accumulent du mannitol. Ce processus impliquerait la M6PR, à ce jour caractérisée seulement chez le céleri et l'Orobanche rameuse (Loescher *et al.*, 1992 ; Everard *et al.*, 1993 ; Robert *et al.*, 1999a ; Delavault *et al.*, 2002). Dans l'optique d'isoler une séquence *M6PR* chez *S. hermonthica*, des amorces sont élaborées à partir d'ORF *M6PR* d'*A. thaliana*, de blé et de riz. L'amplification des séquences *M6PR* d'*Arabidopsis*, du céleri et de l'Orobanche rameuse souligne l'homologie des gènes *M6PR* chez ces espèces (Figure 16). Par contre, aucune amplification n'est possible chez *S. hermonthica*, que ce soit à partir d'ADN génomique ou bien d'ADNc. De même, les tests d'immunoprécipitation et d'immunoblots (Figures 17 et 18) avec des anticorps anti-M6PR recombinante d'*O. ramosa* sont négatifs uniquement chez *Striga*. Existe-t-il donc véritablement une M6PR chez ce parasite ? Sinon, l'activité détectée *in vitro* et *in situ* sur gel natif (Robert *et al.*, 1999a) est-elle attribuable à une protéine non spécifique ?

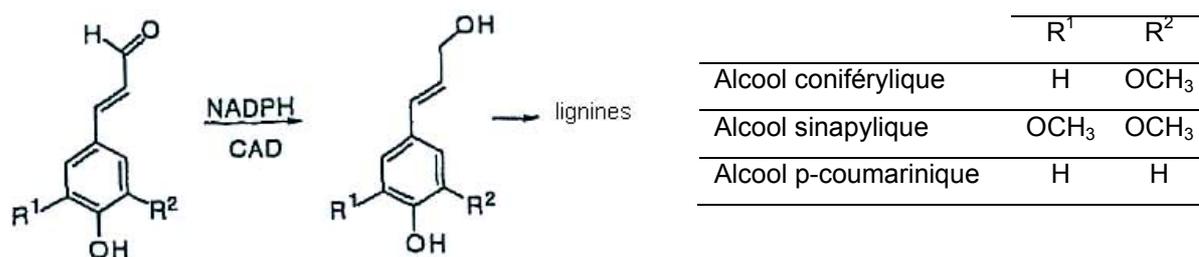
Le microséquençage de la bande à activité M6PR sur gel natif apporte un élément de réponse (Tableau 4). Aucune séquence peptidique de type M6PR n'est effectivement identifiée. Des fragments peptidiques analogues aux séquences de quatre autres protéines sont détectés : la cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD), la malate déshydrogénase (MDH), la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (G3P DH) et la quinone oxydoréductase (Qox). Toutes ces enzymes sont NADPH dépendantes, leurs propriétés sont présentées dans le Tableau 5.

**Tableau 5** – Propriétés des protéines (isoformes) identifiées par microséquençage

(Hawkins et Boudet, 1994 ; Trost *et al.*, 1995 ; Musrati *et al.*, 1998 ; Gao et Loescher, 2000 ; Chareonthiphakorn *et al.*, 2002)

Enzyme	Réaction catalysée	Localisation	Rôle	PM d'une sous-unité
CAD (EC 1.1.1.195)	cinnamoylaldéhyde ↓ cinnamoylalcool	cytosol	Synthèse des précurseurs de lignines	≈ 40 kDa dimères
MDH (EC 1.1.1.37)	oxaloacétate ↓ malate	chloroplaste	Régénération du NADP <sup>+</sup> dans le chloroplaste	≈ 30-35 kDa dimères ou tétramères
G3P DH (EC 1.2.1.12)	glycéraldéhyde 3-P ↓ glycérate 3-P	cytosol	Régénération du NADPH dans le cytosol	≈ 50 kDa dimères ou tétramères
Qox ou DT-Diaphorase (EC 1.3.1.20)	quinone ↓ quinol	cytosol	Détoxification	≈ 25 kDa dimères

La CAD est caractérisée chez de nombreuses Angiospermes telles que le blé (Mitchell *et al.*, 1994), l'eucalyptus (Hawkins et Boudet, 1994), le peuplier (Savidge, 1989), le tabac (Halpin *et al.*, 1992), mais aussi chez des Gymnospermes comme le pin (O'Malley *et al.*, 1992) et l'épicéa (Luderitz et Grisebach, 1981). Elle catalyse, dans le cytosol (Samaj *et al.*, 1998) et de manière réversible, la réduction des aldéhydes hydroxycinnamiques en alcools correspondants : l'alcool coumarinique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Figure 25).



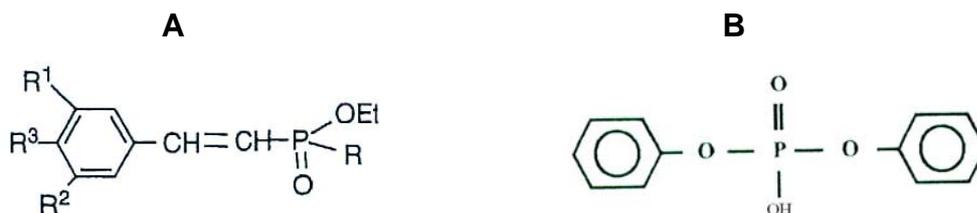
**Figure 25** – Structure des substrats de la CAD

Ces monolignols sont les précurseurs monomériques des complexes polymériques phénoliques des lignines, composés jouant un rôle de soutien et intervenant dans la défense en réponse à une attaque pathogène.

La MDH et la G3P DH sont des enzymes ubiquitaires. A notre connaissance, aucune étude ne témoigne à ce jour d'une affinité de ces enzymes pour le M6P. Il en est de même pour la quinone oxydoréductase.

Notre attention se porte sur la CAD pour plusieurs raisons :

- la localisation cytosolique de cette enzyme,
- la faible spécificité de cette enzyme vis-à-vis de ses substrats,
- l'analogie structurale entre les substrats de la CAD (Figure 25), ses inhibiteurs (Kennedy *et al.*, 1999, Figure 26-A) et ceux de la M6PR (Figure 26-B), qui suggère une similarité structurale du site catalytique de ces deux enzymes.



**Figure 26** – Homologie structurale des inhibiteurs de la CAD et de la M6PR. A – Inhibiteurs de la CAD (R<sup>1</sup> = H ou OCH<sub>3</sub> ; R<sup>2</sup> = H ou OCH<sub>3</sub> ; R<sup>3</sup> = OH ou OCH<sub>3</sub> ; R = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> ou OH ou NHCH<sub>2</sub>Ph) ; B – diphenyl phosphate (DPP), inhibiteur de l'activité M6PR de *Striga* et d'*Orobanche*.

Les travaux de Robert *et al.* (1999b) et de Rousset (2003) ont montré que des molécules aromatiques portant un groupement phosphate ou phosphonate, telles que le phényl phosphate et le DPP, sont de bons inhibiteurs compétitifs de l'activité M6PR vis-à-vis du M6P chez *Striga* et *Orobanche*. La M6PR présente une faible affinité pour son substrat polaire, le M6P ( $K_m$  de 5-8 mM chez *Striga* et *Orobanche*, 13 mM chez le céleri (Everard *et al.*, 1997)), et une affinité plus forte pour des molécules aromatiques ( $K_i$  de 0.7 mM chez *Orobanche*). Cette propriété est retrouvée chez l'aldose réductase (EC 1.1.1.21) qui convertit le glucose ( $K_m$  de 100 mM) en sorbitol, alors que son site catalytique hydrophobe est plus affine pour des molécules aromatiques ( $\approx 20 \mu\text{M}$  ; Wilson *et al.*, 1992).

Ces travaux suggèrent une bifonctionnalité chez ce type d'enzymes. Celle-ci peut être envisagée pour la CAD, qui présente une forte affinité pour les aldéhydes hydroxycinnamiques et alcools correspondants ( $K_m \approx 2$  à  $60 \mu\text{M}$ , Hawkins et Boudet, 1994). Par contre, son affinité vis-à-vis de substrats polaires tels que le M6P, reste à démontrer. Bien que des techniques de purification soient disponibles pour la CAD (Wyrambik et Grisebach, 1975 ; Grima-Pettenati *et al.*, 1994 ; Hawkins et Boudet, 1994), celles-ci n'ont pu être envisagées dans le cadre de ce travail. La purification et la caractérisation de la CAD de *Striga* est donc une perspective majeure. Des anticorps anti-CAD d'eucalyptus ont été produits (Hawkins et Boudet, 1994 ; Samaj *et al.*, 1998) et pourraient faciliter ces travaux. Le microséquençage de la CAD nous permet également d'envisager l'isolement du (des) gène(s) CAD chez *Striga* et la caractérisation de la (des) protéine(s) recombinante(s).

L'inhibition de l'activité CAD par le DPP et la diminution de l'activité M6PR en présence d'alcool coniférylique ont été démontrées sur extraits bruts (Figure 22). Ces résultats appuient l'hypothèse d'une CAD bifonctionnelle. Rousset (2003) a montré l'innocuité du DPP sur la MDH, résultat qui s'oppose à l'établissement d'une telle hypothèse pour cette enzyme. L'effet d'inhibiteurs de la CAD (Kennedy *et al.*, 1999 ; Kruger *et al.*, 2002) sur l'activité M6PR devra également être défini.

Les isoformes de la CAD sont homodimériques ou hétérodimériques, avec des sous-unités de l'ordre de 40 kDa (Luderitz et Grisebach, 1981 ; Savidge, 1989 ; Goffner *et al.*, 1992 ; Halpin *et al.*, 1992), soit un poids moléculaire similaire à celui

de la protéine à activité M6PR de *Striga* (Robert *et al.*, 1999a). L'hypothèse, pour cette enzyme, d'une activité CAD sous forme dimérique et d'une activité M6PR sous forme monomérique est envisageable. La localisation des activités enzymatiques sur gel natif reste à faire, en présence ou non de réducteurs (mercaptoéthanol, DTT). A ce titre, l'inhibition de l'activité M6PR en milieu oxydant est à souligner (Figure 24-E). L'activité CAD mériterait également d'être mesurée dans ces conditions.

Outre une augmentation de l'activité M6PR en réponse à une intensification de la fertilisation azotée et à l'obscurité (Figures 24-A et B), aucun autre paramètre de régulation n'a pu être détecté dans cette étude. Chez le céleri, il existe une relation étroite entre l'activité M6PR, le stade de développement et la capacité photosynthétique des feuilles (Everard *et al.*, 1997). Une telle corrélation n'a pu être observée chez *Striga* (Figure 24-C), ce qui attesterait encore une fois de la particularité de cette protéine chez le parasite. Précisons enfin, qu'aucune information n'est actuellement disponible sur la régulation de la CAD.

## CONCLUSION

Les plantes parasites productrices de mannitol telles que l'Orobanche rameuse et *Striga hermonthica* représentent aujourd'hui une réelle menace pour des cultures d'intérêt agro-alimentaire (légumineuses, céréales). Ces parasites produisent du mannitol, contrairement à leurs hôtes, et expriment donc de manière spécifique, une protéine à activité M6PR. Cette dernière constitue ainsi une cible biochimique d'intérêt dans la lutte contre de tels parasites.

La M6PR caractérisée chez une plante autotrophe, le céleri et chez un holoparasite, *O. ramosa* se révèle relativement bien conservée. Par contre, la protéine présentant cette activité chez *S. hermonthica* est particulière. L'objectif de ce travail était donc de caractériser la protéine à activité M6PR de ce parasite.

La purification partielle par chromatographie d'affinité, suivie du microséquençage par spectrométrie de masse a permis de confirmer l'inexistence d'une M6PR "classique" de type céleri ou orobanche chez *Striga*. Ce résultat explique l'absence d'hybridation des amorces *M6PR* utilisées avec la séquence codant pour la protéine à activité M6PR de *S. hermonthica*, ainsi que la non-reconnaissance de cette protéine par les anticorps anti-M6PR recombinante.

L'identification par microséquençage de fragments peptidiques d'une CAD au voisinage de 35 kDa, zone de poids moléculaire où a été localisée l'activité M6PR, ainsi que l'analogie structurale des inhibiteurs de l'activité M6PR et de l'activité CAD, suggère l'existence d'une activité M6PR non spécifique assurée par la CAD chez *S. hermonthica*. Cette hypothèse est confortée par l'effet inhibiteur d'une part, de l'alcool coniférylique, substrat de la CAD, sur l'activité M6PR, et d'autre part, du DPP, inhibiteur de l'activité M6PR, sur l'activité CAD. Des études complémentaires sont cependant nécessaires, l'objectif majeur étant de purifier et de caractériser la CAD chez *S. hermonthica*.

Les essais préliminaires visant à identifier des facteurs de régulation de l'activité M6PR ont montré une inactivation irréversible en milieu oxydant. L'étude de l'influence de l'environnement rédox sur l'activité CAD s'avère aussi nécessaire. De nouveaux tests d'activité enzymatique devront également être réalisés sur des fractions purifiées.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Atawodi, S.E., Bulus, T., Ibrahim, S., Ameh, D.A., Nok, A.J., Mamman, M. and Galadima, M., 2003.** *In vitro* trypanocidal effect of methanolic extract of some nigerian savannah plants. *African J. Biotech.* **2** (9) : 317-321.
- Ba, A.T., 1984.** Morphology, anatomy and ultrastructure of some parasitic species of the genus *Striga*. In *Striga Biology and Control*, Ayensu, E.S., Doggett, H., Keynes, R.D., Marton-Lefevre, J., Musselman, L.J., Parker, C. and Pickering, A. (Eds), ICSU Press, Canada, pp.47-61.
- Badami, S., Gupta, M.K. and Suresh, B., 2003.** Antioxydant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*. *J. Ethnopharmacol.* **85** : 227-230.
- Bhargava, S.K., 1986.** Estrogenic and post-coital contraceptive activity in rats of butin isolated from *Butea monosperma* seed. *J. Ethnopharmacol.* **18** : 95 - 101.
- Boone, L.S., Fate, G., Chang, M. and Lynn, D.G., 1995.** Seed germination. In *Parasitic Plants*, Press, M.C. and Graves, J.D. (Eds), Chapman & Hall, London, pp.14-38.
- Bradford, M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the princip of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Chareonthiphakorn, N., Wititsuwannakul, D., Golan-Goldhirsh, A. and Wititsuwannakul, R., 2002.** Purification and characterization of NAD(P)H quinone reductase from the latex of *Hevea brasiliensis* Mull.-Arg. (*Euphorbiaceae*). *Phytochemistry* **61**(2) : 123-128.
- Cheong, H., Ryu, S.Y., Oak, M.H., Cheori, S.H., Yoo, G.S. and Kim, K.M., 1998.** Studies of structure activity relationship of flavonoids for the antiallergic actions. *Arch. Pharmacol. Res.* **21** : 478-480.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B. and Wall, M.E., 1966.** Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.) : isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154** : 1189 - 1190.
- Delavault, P., Simier, P., Thoiron, S., Véronési, C., Fer, A. and 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. Plant.* **115** : 48-55.
- Devouge, V. 2003.** L'interférence ARN (RNAi) chez *Arabidopsis thaliana* : une méthode de lutte contre les plantes parasites ? Rapport DEA biologie cellulaire, Université de Nantes. 32 pages.

**Eplee, R.E., 1984.** Chemical control of *Striga*. In *Striga Biology and Control*, Ayensu, E.S., Doggett, H., Keynes, R.D., Marton-Lefevre, J., Musselman, L.J., Parker, C. and Pickering, A. (Eds), ICSU Press, Canada, pp.113 - 123.

**Eplee, R.E. and Norris, R., 1995.** Control of parasitic weeds. In *Parasitic Plants*, Press, M.C. and Graves, J.D. (Eds), Chapman & Hall, London, pp.257 - 277.

**Everard, J.D., Franceschi, V.R. and Loescher W.H., 1993.** Mannose 6-phosphate reductase, a key enzyme in photoassimilate partitioning, is abundant and located in the cytosol of photosynthetically active cells of celery (*Apium graveolens* L.) source leaves. *Plant Physiol.* **102** : 345-356.

**Everard, J.D., Gucci, R., Kann, S.C., Flore, J.A. and Loescher, W.H., 1994.** Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.* **106** : 281-292.

**Everard, J.D., Cantini, C., Grumet, R., Plummer, J. and Loescher W.H., 1997.** Molecular cloning of mannose 6-phosphate reductase and its developmental expression in celery. *Plant Physiol.* **113** : 1427-1435.

**Farmakalidis, E., Hathcock, J.N. and Murphy, P.A., 1985.** Oestrogenic potency of genistein and daidzin in mice. *Food Chem. Toxicol.* **23** : 741-745.

**Fer, A., Russo, N., Simier, P., Arnaud, M.C. and Thalouarn, P., 1994.** Physiological changes in a root hemiparasitic Angiosperm, *Thesium humile* (*Santalaceae*), before and after attachment to the host plant (*Triticum vulgare*). *J. Plant Physiol.* **143** : 704-710.

**Frost, D.L., Gurney, A.L., Press, M.C. and Scholes, J.D., 1997.** *Striga hermonthica* reduces photosynthesis in *Sorghum* : the importance of stomatal limitations and a potential role for ABA ?. *Plant, Cell and Environment* **20** : 483-492.

**Gao, Z. and Loescher, W.H. 2000.** NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning and regulation of the non-reversible glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in celery leaves. *Plant Physiol.* **124** : 321-330.

**Goffner, D., Joffroy, I., Grima-Pettenati, J., Halpin, C., Knight, M.E., Schush, W. and Boudet, A.M., 1992.** Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. *Planta* **188** : 48-53.

**Grima-Pettenati, J., Campargue, C., Boudet, A. and Boudet, A.M., 1994.** Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **37**(4) : 941-947.

**Halpin, C., Knight, M.E., Grima-pettenati, J., Goffner, D., Boudet, A. and Schuch, W., 1992.** Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco stems. *Plant Physiol.* **98** : 12-16.

**Harish, M.S., Nagur, M. and Badami, S., 2001.** Antihistaminic and mast cell stabilizing activity of *Striga orobanchioides*. *J. Ethnopharmacol.* **76** : 197-200.

- Harloff, H.J. and Wegmann, K., 1993.** Evidence for a mannitol cycle in *Orobanche ramosa* and *Orobanche crenata*. *J. Plant Physiol.* **141** : 513-520.
- Hausmann, B.I., Hess, D.E., Omany, G.O., Folkertsma, R.T., Reddy, B.V., Kayentao, M., Weltz, H.G. and Geiger, H.H., 2004.** Genomic regions influencing resistance to the parasitic weed *Striga hermonthica* in two recombinant inbred populations of sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 2004 May 25 [Epub ahead of print] .
- Havsteen, B., 1983.** Flavonoids : a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **32** : 1141-1148.
- Hawkins, S.W. and Boudet, A.M., 1994.** Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* hook. *Plant Physiol.* **104** : 75-84.
- Hiremath, S.P., Swamy, H.K.S., Badami, S.M., Patil, S.B. and Londonkar, R.L., 1996.** Postcoital antifertility activity of the plant *Striga densiflora* (*Scrophulariaceae*) on female albino rats. *Int. J. Pharmacognosy* **34**(1) : 48-52.
- Hiremath, S.P., Badami, S., Swamy, H.K.S., Patil, S.B. and Londonkar, R.L., 1997a.** Antiandrogenic effect of *Striga orobanchioides*. *J. Ethnopharmacol.* **56** : 55-60.
- Hiremath, S.P., Rudresh, K. and Badami, S., 1997b.** Antimicrobial activity of various extracts of *Striga sulphurea* and *Hemidesmicus indicus*. *Indian J. Pharm. Sci.* **59**(3) : 145-147.
- Hiremath, S.P., Badami, S., Hunasagatta, S.K. and Patil, S.B., 2000.** Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *Eur. J. Pharmacognosy* **391** : 193-197.
- Hiron, J.C., 2003.** Ces parasites prélèvent leur dû sur la culture. In *Le Sillon*, Hiver 2003-2004, Deer and Company (Ed), Mohn Media (All.), ISSN 0932-0334, pp.15-16.
- Hodgson, J.F., 1973.** Aspects of the carbon nutrition of angiospermous parasites. Ph.D. thesis, University of Sheffield.
- Huber, S.C. and Huber, J.L.A., 1992.** Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* **99** : 1275-1278.
- Huber, S.C., and Huber, J.L., 1996.** Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47** : 431-444.
- Hussain, H.S.N. and Deeni, Y.Y., 1991.** Plants in Kano Ethnomedicine; screening for antimicrobial activity and alkaloids. *Int. J. Pharmacognosy* **29**(1) : 51-56.
- Igbinnosa, I. and Thalouarn, P. 1996.** Nitrogen assimilation enzyme activities in witchweed (*Striga*) in hosts presence and absence. *Weed Science* **44** : 224-232.

**Kaiser, W.M. and Huber, S.C., 1994.** Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol.* **106** : 817-821.

**Kellis, J.M. and Vickery, L.E., 1984.** Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science* **225** : 1032-1034.

**Kennedy, K., Baltas, M., Douglas, K.T., Duran, H., Embrey, K.J., Giraudon, J.G., McKie, J.H., Grima-Pettenati, J. and Gorrichon, L., 1999.** Rational inhibitor design, synthesis and NMR spectroscopic study by transferred nuclear overhauser spectroscopy of novel inhibitors of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a critical enzyme in lignification. *J. Enzyme Inhib.* **14**(3) : 217-237.

**Kruger, W.M., Carver, T.L.W. and Zeyen, R.J. 2002.** Effects of inhibiting phenolic biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery mildew resistance genes or alleles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **61** : 41-51.

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

**Lagoke, S.T.O., Parkinson, V. and Agunbiade, R.M., 1991.** Parasitic weeds and control method in Africa. In *Combating Striga in Africa, Proceedings of the international workshop IITA/ICRIST/IDRC*, Kim (Eds), Ibadan, Nigeria, pp 3-14.

**Loescher, W.H., Tyson, R.H., Everard, J.D., Redgwell, R.J., Bieleski, R.L., 1992.** Mannitol synthesis in higher plants: evidence for the role and characterization of a NADP-dependent mannose-6-phosphate reductase. *Plant. Physiol.* **98** : 1396-1402.

**Loescher, W.H. and Everard, J.D., 1996.** Sugar alcohol metabolism in sinks and sources. In *Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships*, Zamski, E. and Schaffer, A.A. (Eds), Marcel Dekker, Inc., NY, Basel, Hong Kong, pp.185-207.

**Luderitz, T. and Grisebach, H., 1981.** Enzymatic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Biochem.* **119** : 115-124.

**Mann, M., Ronald C. Hendrickson, R.C. and Pandey, A., 2001.** Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70** : 437-473.

**Mitchell, H.J., Hall, J.L. and Barber, M.S., 1994.** Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol.* **104** : 551-556.

**Musrati, R.A., Kollarova, M., Mernik, N. and Mikulasova, D., 1998.** Malate dehydrogenase : distribution, function and properties. *Gen. Physiol. Biophys.* **17**(3) : 193-210.

**Miksicek, R.J., 1993.** Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.* **44** : 37-43.

- Molau, U., 1995.** Reproductive ecology and biology. In *Parasitic Plants*, Press, M.C. and Graves, J.D. (Eds), Chapman & Hall, London, pp.141-176.
- Musselman, L.J. and Press, M.C., 1995.** Introduction to parasitic plants. In *Parasitic Plants*, Press, M.C. and Graves, J.D. (Eds), Chapman & Hall, London, pp.1-13.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W., 1988.** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Electrophoresis* **9**(6) : 255-262.
- Noiraud, N., Maurousset, L. and Lemoine, R., 2001.** Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *The Plant Cell* **13** : 695-705.
- Nour, J. J. and Todd, P., 1984.** The role of mannitol in *Striga hermonthica* and other parasitic angiosperms. *Third Int. Symp. on Parasitic Weeds*, Aleppo, pp. 81-89.
- Okonkwo, S.N.C., 1966.** Studies on *Striga senegalensis* Benth. I. Mode of host parasite union and haustorial structure. *Phytomorph.* **16** (4) : 453-463.
- O'Malley, D.M., Porter, S. and Sederoff, R.R., 1992.** Purification, characterization and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiol.* **98** : 1364-1371.
- Pageau, K., Simier, P., Naulet, N., Robins, R. and Fer, A., 1998.** Carbon dependency of the hemiparasite *Striga hermonthica* on *Sorghum bicolor* determined by carbon isotopic and gas exchange analyses. *Aust. J. Plant Physiol.* **25** : 695-700.
- Pageau, K., Simier, P., Le Bizec, B., Robins, R.J. and Fer, A., 2003.** Characterization of nitrogen relationships between *Sorghum bicolor* and the root-hemiparasitic angiosperm *Striga hermonthica* (Del.) Benth. using  $K^{15}NO_3$  as isotopic tracer. *J. Exp. Bot.* **54** : 789-799.
- Pathak, D., Pathak, K., Singla, A.K., 1991.** Flavonoids as medicinal agents – recent advances. *Fitoterapia* **62** : 371-389.
- Pathak, V.N., Chatuverdi, R.K., Sharma, S., Jain, M. and Joshi, K.C., 1993.** Non-steroidal antifertility agents. *Pharmazie* **48** : 323-339.
- Press, M.C., Shah, N. and Stewart, G.R., 1986.** The parasitic habit : Trends in metabolic reductionism. In *Proceedings of a workshop on biology and control of Orobanche*, Borg, S.J. (Ed), LH/VPO, Wageningen, The Netherlands, pp. 96-106.
- Press, M.C., Tuohy, J.M. and Stewart, G.R., 1987.** Gas exchange characteristics of the *Sorghum-Striga* host-parasite association. *Plant Physiol.* **84** : 814-819.
- Press, M.C.M., 1989.** Autotrophy and heterotrophy in root hemiparasite. *Trends Ecol. Evol.* **4** : 258-263.

**Riches, C.R. and Parker, C., 1995.** Parasitic plants as weeds. In *Parasitic Plants*, Press, M.C. and Graves, J.D. (Eds), Chapman & Hall, London, pp.226 - 255.

**Robert, S., 1997.** Contribution à l'étude de la mannose 6-phosphate réductase (E.C.1.1.1.224), enzyme clé du métabolisme carboné des plantes supérieures parasites : purification, caractérisation et recherche d'inhibiteurs. Thèse de Doctorat, Université de Nantes. 231 pages.

**Robert, S., Simier, P. and Fer, A., 1999a.** Purification and characterization of mannose 6-phosphate reductase, a potential target for the control of *Striga hermonthica* and *Orobanche ramosa*. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**(3) : 233-237.

**Robert, S., Dubreuil, D., Simier, P., Pradere, J.P. and Fer, A., 1999b.** Inhibition studies on mannose 6-phosphate reductase purified from *Orobanche ramosa*. *Carb. Lett.* **3**(4) : 231-238.

**Rousset, A., 2003.** Contribution à la lutte chimique contre les plantes parasites productrices de mannitol. Identification et caractérisation d'inhibiteurs *in vitro* de la mannose 6-phosphate-réductase (EC 1.1.1.224) et étude de leur activité sur des modèles biologiques simplifiés (protoplastes et cals). Thèse de Doctorat, Université de Nantes. 271 pages.

**Rumpho, M.E., Edwards, G.E. and Loescher, W.H., 1983.** A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves, activity and localization of key enzymes. *Plant Physiol.* **73** : 869-873.

**Sallé, G., Tuquet, C. and Neumann, U., 2000.** In *Comptes-rendus de l'Académie d'Agriculture de France* **86**(8). Revue Bimestrielle ISSN 0989-6988, pp.59-67.

**Samaj, J., Hawkins, S., Lauvergeat, V., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A., 1998.** Immunolocalization of cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD 2) indicates a good correlation with cell-specific activity of CAD 2 promoter in transgenic poplar shoots. *Planta* **204**(4) : 437-443.

**Savidge, R.A., 1989.** Coniferin, a biochemical indicator of commitment to tracheid differentiation in conifers. *Can. J. Bot.* **67** : 2663-2668.

**Sauerborn, J., 2001.** Angiospermous root parasites and fungi as natural antagonists. In *Proceedings of the seventh international symposium of parasitic weeds*, Fer, Thalouarn, Joel, Musselman, Parker and Verkleij (Eds), pp 248-251.

**Shukla, S., 1993.** Post-coital contraceptive efficiency of *Pueraria tuberosa*. *Indian Drugs* **30** : 510-512.

**Simier, P., Robert, S. and Fer, A., 1998.** Mannitol metabolism in darkness in the leaves of the hemiparasitic angiosperm, *Thesium humile*. *Plant Physiol. Biochem.* **36** : 237-245.

**Singh, L., Ndikawa, R. And Rao, M.R., 1991.** Integrated approach to *Striga* management on *Sorghum* in North Cameroon. In *Proceedings of the fifth international symposium of parasitic weeds*, Ransom, Musselman, Worsham and Parker (Eds), Nairobi, Kenya, pp 223-231.

**Stewart, G.R., Nour, J., MacQueen, M. and Shah, N., 1984.** Aspects of the biochemistry of *Striga*. In *Striga Biology and Control*, Ayensu, E.S., Doggett, H., Keynes, R.D., Marton-Lefevre, J., Musselman, L.J., Parker, C. and Pickering, A. (eds), ICSU Press, Canada, pp.161-178.

**Stewart, G.R. and Press, M.C., 1990.** The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41** : 127-151.

**Teo, C.K.H., 1993.** The uses of Witchweed (*Striga asiatica*) in traditional medicine. *Hortorium* **28** : 1-8.

**Thalouarn, P. and Fer, A., 1993.** Le *Striga*, un ravageur de cultures vivrières : le point sur les connaissances récentes et sur les méthodes de lutte. *Cahiers Agricultures* **2** : 167-182.

**Trost, P., Bonora, P, Scagliarini, S. and Pupillo, P., 1995.** Purification and properties of NAD(P)H : (quinone-acceptor) oxidoreductase of sugarbeet cells. *Eur. J. Biochem.* **234**(2) : 452-458.

**Wegmann, K., 1986.** Biochemistry of osmoregulation and possible biochemical reasons for resistance against *Orobanche*. In *Proc. Workshop on Biology and Control of Orobanche*, S. J. ter Borg, (Ed) Wageningen, The Netherlands : LHVPO, pp. 107-113.

**Wilson, D.K., Bohren, K.M., Gabbay, K.H. and Quioco, F.A., 1992.** An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* **257** : 81-84.

**Wyrambik, D. and Grisebach, H., 1975.** Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* **59**(1) : 9-15.

**Yokota, T., Sakai, H., Okuno, K., Yoneyama, K. and Takeuchi, Y., 1998.** Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry* **49** (7) : 1967-1973.

**(87 Références)**

**NOM - Prénoms :** PACAUD - Hélène, Marie Pierre

**Titre de la Thèse :** Les Angiospermes parasites : particularité de la mannose 6-phosphate réductase chez l'hémiparasite *Striga hermonthica*

---

**Résumé de la Thèse :**

Depuis quelques dizaines d'années, les Angiospermes parasites font l'objet d'un intérêt croissant car l'absence de méthodes de lutte efficaces favorise largement leur extension en Europe et en Afrique. Parmi eux, l'hémiparasite *Striga hermonthica* est ainsi devenu une menace réelle pour les cultures céréalières du continent africain. Ce parasite produit du mannitol, contrairement à ses hôtes. Il exprime donc de manière spécifique, une protéine à activité mannose 6-phosphate réductase (M6PR), qui constitue ainsi une cible biochimique d'intérêt dans la lutte contre *Striga*. Alors que la structure de cette enzyme est conservée chez une plante autotrophe comme le céleri et chez une plante parasite comme *Orobanche ramosa*, la protéine à activité M6PR de *Striga hermonthica* est originale. Chez ce parasite, le microséquençage du spot protéique présentant une activité M6PR sur gel natif révèle l'absence d'une protéine M6PR et suggère l'implication d'une protéine non spécifique, la cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD), dans l'activité M6PR détectée. L'inhibition, d'une part, de la CAD par le diphényl phosphate (inhibiteur spécifique de la M6PR), et d'autre part, de la M6PR par l'alcool coniférylique (substrat de la CAD) est un argument supplémentaire en faveur de l'existence, chez *Striga*, d'une activité M6PR non spécifique assurée par la CAD. Des travaux complémentaires seront néanmoins nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

---

**MOTS CLES :**

CINNAMYL ALCOOL DESHYDROGENASE, MANNITOL, MANNOSE 6-PHOSPHATE REDUCTASE, PLANTE PARASITE, *STRIGA*.

---

**JURY**

**PRESIDENT :** M. Christos ROUSSAKIS, MCU de Pharmacognosie  
Faculté de Pharmacie de Nantes

**ASSESEURS :** Mme Claire SALLENAVE - NAMONT, MCU de Cryptogamie, Botanique  
et Biotechnologies. Faculté de Pharmacie de Nantes  
M. Philippe SIMIER, MCU de Physiologie Végétale  
Faculté des Sciences et des Techniques de Nantes  
M. Eric GUILBERT, Pharmacien  
26, Rue Martin Luther King 44240 LA CHAPELLE SUR ERDRE

---

**Adresse de l'auteur :** 14, Rue Edgar Quinet 44100 NANTES