HAL
open science

# Functional analysis in Botrytis cinerea by an inducible silencing method of the putative sterol 3-keto reductase encoding gene erg27 the suggested target of the fungicide fenhexamid

Alexis A. Billard, Jocelyne J. Bach, Pierre P. Leroux, Sabine, Helma S. H. Fillinger-David, H. Lachaise, R. Beffa, Danièle D. Debieu, . Bayer Cropscience France

## To cite this version:

Alexis A. Billard, Jocelyne J. Bach, Pierre P. Leroux, Sabine, Helma S. H. Fillinger-David, H. Lachaise, et al.. Functional analysis in Botrytis cinerea by an inducible silencing method of the putative sterol 3-keto reductase encoding gene erg27 the suggested target of the fungicide fenhexamid. 8. Rencontres de Phytopathologie - Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (SFP), Jan 2010, Aussois, France. hal-02752050

**HAL Id: hal-02752050**

**https://hal.inrae.fr/hal-02752050v1**

Submitted on 3 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Poster n°4.1**

# Functional analysis of the Mps1 MAP kinase pathway in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*

**C. Ant** (1), C. Chaintreuil, (1), C. Bonnet (1), A. Lappartient (2), R. Beffa (2), C. Cartwright (3), N. Talbot (3), M.-H. Lebrun (1)

(1) CNRS/Bayer CropScience, 14-20 rue Pierre Baizet, 69263 Lyon
(2) BayerCropScience, Lyon, France
(3) University of Exeter, Angleterre

Cell wall integrity is crucial for fungal growth, development and stress survival. In yeast, Slt2 MAP kinase and calcineurin signaling pathways monitor cell wall repair during stress and development. MPS1, the *M. grisea* SLT2 orthologue, is essential for cell wall repair and for appressorium mediated penetration into host plants (Xu 1998 PNAS 95:12713). In yeast, Slt2 activates the transcription factors Rlm1, Swi4 and Swi6, while calcineurin activates Crz1. Genes orthologous to yeast *CRZ1*, *MPS1*, *RLM1*, *SWI4*, and *SWI6* genes were identified in *M. grisea* genome. Swi4 and Swi6 interact with Mps1 in yeast two hybrid assays. Deletion mutants were constructed by targeted gene replacement in *M. grisea*. *Delta-mps1* mutants displayed an abnormal mycelial growth (no aerial hyphae), did not sporulate, and were non-pathogenic on plants as reported. *Delta-crz1*, *delta-rlm1*, *delta-swi6* mutants have a normal mycelial growth and sporulation rates similar to wild type. Of these three mutants, only *delta-Rlm1* displays a highly reduced pathogenicity on barley and rice (-98%, lesion number). *Delta-mps1* mutants are highly sensitive to nikkomycin Z (chitin synthase inhibitor), CFW (disorganization of cell wall) and aculeacine (glucan synthase inhibitor), while *delta-crz1* and *delta-rlm1* mutant are only mildly hypersensitive to Nikkomycin, and *delta-swi6* mutant is only slightly hypersensitive to CFW. These studies suggest that the transcription factors controlled by Mps1 are either functionally redundant or specialized in the control of specific target genes.

*Keywords: Magnaporthe grisea*, Cascade de signalisation MAP kinase

**Poster n°4.2**

# Identification de gènes candidats impliqués dans les processus de résistance de l'hévéa à *Microcyclus ulei* par la technique des macroarrays

**A. Berger** (1), M. Déon (2), F. Doaré (3), E. Goujon (2), D. Garcia (4), M. Seguin (1), V. Pujade-Renaud (5)

(1) CIRAD, TA96/03 bureau 162 UMR DAP Avenue Agropolis, 34398 Montpellier
(2) PIAF, 24 avenue des Landais, 63177 Clermont ferrand
(3) UPR Bioagresseurs de pérennes BP 701 - 97387 Kourou Cedex - Guyane
(4) Universidade Estadual de Santa Cruz - CBG - 45650-000 Ilhéus BA - Brésil
(5) CIRAD 24 avenue des landais, 63177 Aubière

La Maladie Sud Américaine des feuilles (SALB, South American Leaf Blight), de l'hévéa, provoquée par le champignon Ascomycète *Microcyclus ulei*, est un frein majeur au développement de l'hévéaculture en Amérique latine. Bien qu'encore confinée au continent sud-américain, la propagation de cette maladie en Asie, qui concentre plus de 90% de la production mondiale de caoutchouc naturel, aurait des répercussions socio-économiques dramatiques. Les méthodes de lutte chimique, agronomique ou biologique étant difficiles à mettre en œuvre sur plantations adultes, un programme d'amélioration variétale a été développé depuis 1992 au Brésil dans le cadre d'un partenariat CIRAD - Michelin visant la sélection de variétés productrices et résistantes au SALB. Afin d'identifier des gènes candidats associés à la résistance, six banques d'ESTs soustractives (Foward et Reverse) ont été produites avec le kit Clontech PCR-select cDNA substraction, en comparant les génotypes d'hévéa PB260 (haut producteur, sensible) et RO38 (bas producteur, tolérant) au cours des 4 premiers jours après infection. Trois mille six cents ESTs (900 unigènes par banque, pour 4 des 6 banques) ont été amplifiés puis fixés sur membrane Hybond N+ (Amersham). Les membranes ont été hybridées avec différentes populations d'ADNc cible marquées au P33, issues du génotype sensible et du génotype tolérant à différents temps après infection. La détection et l'intensité des spots ont été obtenues respectivement avec les programmes Storm Scanner Control (version5.03) et ImageQuant TL (Amersham Biosciences). Les signaux ont été normalisés par rapport à un contrôle actine, analysés grâce aux programmes CLUSTER package analysis (Eisen *et al,* 1998) et TreeView. Des gênes candidats potentiellement associés à la résistance ou la sensibilité de l'hévéa à *Microcyclus ulei* ont été identifiés d'après les clusters d'expression. Ils seront validés par PCR en temps réel avant d'être cartographiés.

*Mots-clés :* SALB, Hévéa*, Microcyclus ulei,* macroarrays

**Poster n°4.3**

# Functional analysis in *Botrytis cinerea* by an inducible silencing method of the putative sterol 3-keto reductase encoding gene *erg27* the suggested target of the fungicide fenhexamid.

**A. Billard** (1,2), J. Bach (2), P. Leroux (1), S. Fillinger (1), H. Lachaise (2) , R. Beffa (2), D. Debieu (1)

(1) INRA Versailles BIOGER CPP Fungicides
(2) Bayer CropScience Biochemistry Department (Lyon)

Fenhexamid is one of the latest SBIs approved on grapevine. It has a small spectrum and is essentially active towards *Botrytis cinerea* and related species, like *Monilia spp* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Biochemical experiments allow to identify the enzymatic target (the 3-keto reductase encoded by the *erg27* gene) involved in the C4 demethylation processes of sterol biosynthesis. The double C4 demethylation process is a complex step of ergosterol biosynthesis where two methyl groups are eliminated sequencially. This step involves four enzymes. Erg27 reduces the ketone function at the position C3 to form 4a-methylfecosterone and then to fecosterone. Sterol-supplemented Saccharomyces cerevisiae *erg27* knock-out mutants exhibit a surprising phenotype: instead of Erg27 precursor accumulations (the C3 unreduced compound), squalene and oxidosqualene are the major compounds found. This particularity is due to the second role of erg27, the digest activation of the oxidosqualene cyclase (encoded by *Erg7p*) involved at the beginning of the sterol pathway. These results underline the importance of Erg27 in regulation of sterol metabolism. *Erg27* mutants obtained in Saccharomyces cerevisiae exhibit lethal phenotypes. Considering this fact a silencing construct under the control of an inducible promoter was chosen to reduce *erg27* gene expression, for the functional analysis of the *B. cinerea* erg27 gene. Mutants show phenotype alterations essentially in growth, increased sensibility to diverse compounds, conidia production deficiency and modifications in sterol content.

*Keywords:* Ergosterol synthesis, *Botrytis cinerea*, Fungicide

**Poster n°4.4**

# Impact of *erg27* mutations in fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea*: a reverse genetic approach

**A. Billard (**1,2), J. Bach (1), P. Leroux (1), S. Fillinger (1), H. Lachaise (2), R. Beffa (2), D. Debieu (1)

(1) INRA Versailles BIOGER CPP Fungicides
(2) Bayer CropScience Biochemistry Department (Lyon)

*Botrytis cinerea* is a devastating pathogen attacking vinegrapes. In France, to control this disease, one of the most employed fungicide is the Sterol Biosynthesis Inhibitors (SBI) fenhexamid (Bayer AG - Hydroxyanilide family). Fenhexamid is the only SBI fungicide targeting the C4-demethylation processe, this new mode of action gives the advantage of the absence of positive cross resistance towards usual routinely used fungicides. Biochemical experiments allow to identify the enzymatic target (the 3-keto reductase encoded by the *erg27* gene) involved in the C4 demethylation processes of sterol biosynthesis. Since its introduction, annual *Botrytis cinerea* monitoring deployed on french vineyards allowed to detect several kinds of strains résistant to fenhexamid (HydR1, HydR2 and HydR3). These strains show various degrees of sensitivity and differences development stages where resistance is expressed. The $HydR3^+$ & $HydR3^-$ strains are the most frequent strains in vineyards. $HydR3^+$ has a higher IC50 value (>10ppm) than $HydR3^-$.

*Keywords: Botrytis cinerea*, antifungal resistance, SNP, reverse genetic

# AvrCO39, un effecteur du pouvoir pathogène de *Magnaporthe oryzae* ?

**S. Cesari**, C. Ribot, J.-L. Nottéghem, T. Kroj

UMR BGPI, Montpellier, Campus International de Baillarguet, TA A54/K, 34398 Montpellier cedex 5

Les protéines sécrétées par les agents pathogènes dans les tissus de leur plante hôte jouent un rôle central dans les processus infectieux des champignons, des oomycètes et des bactéries. Ces protéines sont considérées comme des effecteurs de leur pouvoir pathogène. Leur identification et leur caractérisation chez les champignons phytopathogènes représente un enjeu important pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'infection et pour identifier les processus de défense de la plante hôte ciblés par ces agents pathogènes. AvrCO39, une petite protéine du champignon ascomycète *Magnaporthe oryzae*, pathogène majeur du riz, est considérée comme un effecteur. Elle agit comme protéine d'avirulence sur des cultivars de riz possédant le gène de résistance *Pi-CO39*. Cependant, son rôle dans le développement de la maladie est inconnu et elle ne montre pas d'homologies avec d'autres protéines. L'existence d'un signal de sécrétion et d'un motif « RxLR-like » au sein de la séquence protéique d'AvrCO39 suggère que cet effecteur puisse être sécrété par le champignon, puis transféré dans le cytoplasme des cellules de la plante hôte lors de l'interaction. Afin de comprendre le mode d'action d'AvrCO39, des approches visant à identifier les protéines et les processus de l'hôte ciblés ont été initiées.

*Mots-clés :* AvrCO39*, Magnaporthe oryzae,* effecteur, riz, pouvoir pathogène

# Spatio-temporal study of defense genes in grapevine

**S. Colas**, S. Manteau, C. Clement, F. Baillieul, F. Mazeyrat-Gourbeyre, L. Monti-Dedieu

Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, URVVC-SE EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Pathogenesis-related (PR) proteins are important elements of the plant defense machinery. In grapevine (*V. vinifera L. cv* Pinot Noir) previous studies have shown that a chitinase (CHV5) and a thaumatin-like protein (TL) accumulate in berries during fruit maturation and represent the two most abundant extractable proteins of ripe berries (Derckel *et al.* 1998 ; Manteau 2003). The aim of this work is to investigate how the expression of both PR-proteins is affected by abiotic and biotic stresses. We showed that CHV5 and TL are induced in leaves and young berries by UV-C irradiation as well as in leaves during *Botrytis cinerea* infection. These results confirm that CHV5 and TL are referred to as PR-proteins. On the opposite in ripe berries collected in vineyard, CHV5 and TL proteins decreased as the infection by *Botrytis cinerea* develops. This necrotrophic fungus was then supposed to degrade these proteins. In addition CHV5 and TL mRNAs also decreased during this infection process, suggesting that another mechanism is involved. To investigate the molecular interactions between *B. cinerea* and *V. vinifera* and to explain proteins degradation and mRNAs decrease, we studied the tissular localization expression of both PR-proteins by in situ hybridization and immunolocalization. The first results showed that after UV-C irradiation of young berries, TL mRNAs accumulated around vascular bundles in the pulp and the exocarp and CHV5 mRNAs mainly around proximal vessels. Immunolocalization studies showed that CHV5 proteins localized in the epicarp as well as around the vascular bundles, suggesting that the anti-CHV5 antibody used may bind to several isoforms. Localization of mRNAs/proteins sites in *B. cinerea*-infected berries is under investigation. In addition, proteins production by heterologous system (in progress) will allow us to characterize these two PR-proteins and to better understand the mechanisms of interaction between *B. cinerea* and *V. vinifera* PR-proteins.

(1) Derckel J.P, Audran J.C, Haye B, Lambert B, Legendre L.; 1998: Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against Botrytis cinerea of chitinases and b-1,3-glucanases of ripening grape berries. Physiol Plantarum 104, 56-64.
(2) Manteau S.; 2003: Etude des facteurs de virulence de *Botrytis cinerea* et des protéines de défense de la baie. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne.

*Keywords:* PR-proteins, chitinase, thaumatin-like, defense, *Botrytis cinerea*

**Poster n°4.7**

# Protein secretion during ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and poplar.

**C. Commun**, A. Kohler, F. Martin, A. Brun, C. Veneault-Fourrey

UMR INRA-UHP 1136 Interactions Arbres - Microorganismes, IFR 110 EFABA (Ecosystèmes Forestiers Agroressources, Bioprocédés et Alimentation) 54280 Champenoux, France

The symbiotic basidiomycete *Laccaria bicolor* is a cosmopolitan and common genus of fungus reported from numerous ectomycorrhizal plant communities. Association between *L. bicolor* and the tree *Populus trichocarpa* (poplar) is our favourite model to deciphering molecular dialogue of symbiosis. Recent studies highlight that development of a functional biotrophic interface between these two partners likely needs active secretion of fungal effectors. The recent sequencing of *L. bicolor* genome (1) combined with « transcriptomic » analyses using « whole-genome oligoarrays » allowed us to establish and to present a global view of the fungal secretion pathway. In order to demonstrate the importance of this pathway during ectomycorrhiza formation and/or development, molecular analyses of different genes are underway. In addition, « transcriptomic » analyses identify several candidate genes which expression is up-regulated within symbiotic tissues (1). Among them, we focus on predicted secreted proteins such as glycoside hydrolases (GH) and expansins. These enzymes are likely involved in fungal cell wall remodelling. Antibodies were designed against one GH5 and one expansin. Preliminary immunofluorescence experiments show a specific localisation to Hartig net and internal mantle of the ectomycorrhiza.

(1) Martin *et al.* 2008; Nature Vol 452: 88-93

*Keywords: Laccaria bicolor*, ectomycorrhiza, protein secretion

**Poster n°4.8**

# Influence d'une bactérie antagoniste sur l'expression in planta de gènes du pouvoir pathogène de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

**S. Daval**, L. Lebreton, K. Gazengel, A.-Y. Guillerm-Erckelboudt, M. Boutin, A. Sarniguet

INRA, Agrocampus Ouest, Université Rennes 1, UMR 1099 BiO3P 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes', F-35653 Le Rheu, France

Le champignon pathogène *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici (Ggt)*, agent de la maladie du piétin-échaudage du blé, cause des nécroses racinaires. Dans la rhizosphère du blé, des rhizobactéries non-pathogènes réduisent la gravité de la maladie. Ainsi la rhizobactérie antagoniste *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp limite l'extension des nécroses sur racines (Barret *et al.* 2009). Les mécanismes d'antagonisme bactérien décrits reposent pour la plupart sur l'antibiose vis-à-vis du mycélium fongique mais encore peu d'études abordent l'influence des rhizobactéries sur le pouvoir pathogène des champignons d'origine tellurique. Dans cette étude, pour comprendre la variation physiologique du champignon en interaction avec la plante et une bactérie antagoniste, l'expression de gènes fongiques potentiellement impliqués dans le pouvoir pathogène de *Ggt* a donc été comparée *in planta* en absence et en présence de la bactérie Pf29Arp. Une cinétique d'extension de nécroses a été réalisée *in vitro* pendant 10 jours sur plantules de blé inoculées à J0. La bactérie a été (ou non) apportée à J2. L'ADN et l'ARN de racines de blé infectées par *Ggt* ont été extraits à trois temps de la cinétique (J4, J7 et J10). L'expression des gènes *gmk1* MAP-kinase (Dufresne and Osbourn 2001), *gdo* gentisate 1-2 dioxygénase (Daval *et al.* 2009) et de trois laccases (Litvintseva and Henson 2002) a été quantifiée par PCR quantitative. L'expression de ces gènes augmente avec le développement de la nécrose en absence de bactérie, sauf pour le gène d'une laccase. La présence de la bactérie affecte différemment l'expression de chaque gène, le plus souvent en réduisant l'expression au début du développement de la nécrose et en augmentant l'expression à un stade plus avancé d'extension de nécrose. Au contraire l'expression du gène d'une laccase est augmentée par la présence de la bactérie. Ces résultats montrent que la présence d'une rhizobactérie à la surface de la racine modifie le profil d'expression de gènes de *Ggt*.

(1) Barret *et al.* 2009 Mol. Plant-Microb. Inter. (In press)
(2) Daval *et al.* 2009 Plant Pathol. (In press)
(3) Dufresne M. and Osbourn A. E. 2001 Mol. Plant-Microb. Inter. 14, pp. 300 -307
(4) Litvintseva M. and Henson J.M. 2002 Appl. Environ. Microbiol., 68: 1305 -1311

*Mots-clés :* pouvoir pathogène, rhizobacteries, expression de gènes, PCR quantitative

**Poster n°4.9**

# Etude du rôle de deux glycosyltransférases du métabolisme secondaire d'*Arabidopsis*, UGT73B3 et UGT73B5, dans l'homéostasie redox lors de la réaction d'hypersensibilité à *Pseudomonas syringae*

**L. Didierlaurent**, C. Simon, M. Langlois-Meurinne, K. Massoud, M. Garmier, P. Saindrenan

UMR 8618, Institut de Biotechnologie des Plantes, CNRS-Université Paris-Sud 11, bât. 630, 91405 Orsay cedex

Les métabolites secondaires jouent des rôles importants dans les réponses de défense des plantes aux agents pathogènes. La conjugaison à un sucre est l'une des modifications les plus répandues qui contribue à la grande diversité et à la réactivité de ces substances naturelles. Les réactions de glycosylation assurées par les glycosyltransférases (UGTs) sont impliquées dans des voies métaboliques, dans la régulation de signaux endogènes et dans le transport de métabolites. Chez *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), les UGTsont codées par 120 gènes, organisés en 14 groupes (A-N). Les UGTs du groupe D sont exprimées de manière différentielle au cours de la réaction d'hypersensibilité (HR) d'*Arabidopsis* à une souche avirulente de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato (Pst-AvrRpm1)* et après traitement par des molécules de signalisation impliquées dans les réponses de défense. Au sein de ce groupe, deux gènes d'intérêt ont été identifiés, *UGT73B3* et *UGT73B5*, impliqués dans la résistance à *Pst-AvrRpm1* et fortement induits par l'acide salicylique (SA) et le peroxyde d'hydrogène (H2O2). Nous avons étudié l'implication de ces deux UGTs dans la régulation du statut redox cellulaire chez *Arabidopsis* en réponse à *Pst-AvrRpm1*. Une analyse de l'accumulation in situ d'espèces réactives d'oxygène (ROS), notamment de H2O2, révèle d'une part une accumulation supérieure chez les lignées d'insertion d'ADN-T, *ugt73b3*, *ugt73b5* et ugt73b3xugt73b5 et chez le mutant *cat2* (déficient en CATALASE 2) et d'autre part, une accumulation moindre chez le mutant *atrbohD* affecté dans la production d'anion superoxyde. Une analyse métabolique de l'accumulation de SA, de scopolétine et de camalexine, indique que les mutants *ugt73b3*, *ugt73b5*, *ugt73b3xugt73b5*, *cat2* et *atrbohD* accumulent différentiellement ces métabolites secondaires liés au stress oxydatif et/ou à la résistance. Des tests de résistance à *Pst-AvrRpm1* montrent que les simples et doubles mutants ugts, ainsi que les mutants *cat2* et *atrbohD* sont compromis dans la résistance à la bactérie avirulente, soulignant l'implication de ces gènes dans la résistance. Cette diminution de la résistance à *Pst-AvrRpm1* est fortement liée aux perturbations redox provoquée par les différentes mutations. Ces résultats suggèrent également que les substrats de ces deux UGTs ont des propriétés antioxydantes.

*Mots-clés :* Métabolites secondaires, Les glycosyltransférases (UGTs), homéostasie redox

**Poster n°4.10**

# Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to fungal and bacterial pathogens in plants

**S. Dorey** (1), L. Sanchez (1), A. L. Varnier (1), P. Vatsa (2), L. Boudesocque (3), J.-H. Renault (3), S. Kauffmann (4), A. Pugin (2), C. Clément (1), F. Baillieul (1)

(1) URVVC-EA 2069, Stress, Défense et Reproduction des Plantes, Université de Reims Champagne-Ardennes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France
(2) UMR Plante-Microbe-Environnement, INRA 1088, CNRS 5184, Université de Bourgogne, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France
(3) Institut de Chimie Moléculaire de Reims, Université de Reims Champagne-Ardennes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France
(4) Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du C.N.R.S., Université Louis Pasteur, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

Rhamnolipids are amphiphilic secondary metabolites produced by some bacteria including Pseudomonas species. For the bacteria, they are involved in biofilm formation, swarming motility, hydrocarbon uptake and are also known as virulent exoproducts on some mammalian cells. Because they are potentially at the plant cells-bacteria interface, we investigated their role as MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) recognized by plant cells. The effect of rhamnolipids was first assessed in grapevine. They induce Ca2+ influx, mitogen-activated protein kinase activation and reactive oxygen species production that form part of early signalling events and they induce the expression of a wide range of defense genes. In *Arabidopsis thaliana* rhamnolipids stimulate the production of signal molecules (including salicylic acid and jasmonic acid) and also induce typical defense marker genes. Rhamnolipids efficiently protect grapevine plants against *Botrytis cinerea*. In addition, *Arabidopsis* plants treated with rhamnolipids are more resistant to the fungus and to the bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000. Using *Arabidopsis* mutants and transgenic lines we found that rhamnolipids-induced resistance to *B. cinerea* and *P. syringae* preferentially involves a SA-dependent pathway. Altogether, our results suggest that rhamnolipids are potent MAMPs conferring resistance in plants. Rhamnolipids are well known as biosurfactants in the industry. They are used for a wide range of applications, especially in food, cosmetic and pharmaceutical formulations as well as in bioremediation of pollutants. Because they have both, elicitor and direct antifungal properties, rhamnolipids have the potential to be part of alternative strategies in order to reduce or replace pesticides. The potential of rhamnolipids as elicitor under field conditions is currently under investigation.

*Keywords:* MAMPs, *Botrytis cinerea,* plant defense

# Efficacité de stimulateurs de défenses des plantes (bth et phosphonates) sur l'oïdium et le mildiou de la vigne : impact de la diversite des pathogenes

**M.-C. Dufour,** M.-F. Corio-Costet

INRA, UMR Santé végétale, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave d'Ornon, France

Les phosphonates, sont connus pour posséder un pouvoir antifongique, mais également pour stimuler les défenses des plantes. Dans cette étude, l'efficacité de deux phosphonates ; le fosétyl-Al et un fertilisant foliaire (PK2) a été évaluée sur différents génotypes et phénotypes de mildiou de la vigne (sensibles ou résistants aux fongicides - *Plasmopara viticola*) et d'oïdium (*Erysiphe necator*- groupe génétique A ou B). Leur efficacité a été comparée à celle de l'aciilbenzolar-S-méthyle, un analogue de l'acide salicylique décrit comme stimulateur des défenses. En parallèle, nous avons également quantifié par RT-Q-PCR l'expression de 16 gènes d'intérêt impliqués dans les défenses des plantes. Il existe des efficacités variables de la stimulation des défenses de la vigne en fonction du groupe d'agents pathogènes considérés. L'expression des gènes de défenses varie selon la molécule stimulatrice mais également selon la variabilité inter et intra espèces des pathogènes. En complément, une étude d'efficacité sur le terrain a été réalisée en 2009 qui compare les efficacités de traitements du fosétyl-Al, de l'acibenzolar-S-méthyle et du mancozèbe vis-à-vis du mildiou après une inoculation artificielle de mildiou

(1) Dufour M.-C., Corio-Costet M.-F., 2009 - Impact of grapevine downy and powdery mildew diversity on efficacy of phosphonate derivatives (fosetyl-AL and fertilizer PK2) and salicylic acid (BTH) described as stimulators of plant defences. IOBC working group, « Induced resistance in plants against insects and diseases », in press.

(2) Dufour M-C., Druelle L., Sauris P., Taris G., Corio-Costet M-F. (2009) Efficacités de stimulateurs de défenses des plantes (BTH et phsophonates) sur l'oïdium et le mildiou de la vigne : impact de la diversité des pathogènes. AFPP, 9ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes (Tours, 4-5 décembre), pp 8. CD-Rom.

*Mots-clés :* défense des plantes, méthodes alternatives, expression de gènes, efficacité terrain*, Erysiphe necator, Plasmopara viticola*

**Poster n°4.12**

# Identification par approches moléculaires de gènes impliqués dans la tolérance aux métaux lourds chez le champignon mycorhizien *Oidiodendron maius*

**H. R. Khouja** (1), S. Abbà (1), M. Vallino (1), E. Martino (1), M. Chalot (2), D. Blaudez (2), S. Perotto (1)

(1) Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università degli Studi di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino, Italy.
(2) Université Henri Poincaré, Nancy I, Faculté des Sciences, UMR 1136 INRA/UHP « Interactions Arbres-Microorganismes », BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

*Oidiodendron maius Zn* est une souche du champignon mycorhizien éricoïde très tolérante au zinc. Cette souche s'avère donc très intéressante pour l'étude des mécanismes de tolérance aux métaux lourds et pour la compréhension du rôle de ce champignon symbiotique dans la protection de sa plante hôte. Pour répondre à ces objectifs, deux approches sont envisagées : (i) le criblage d'une collection de mutants aléatoires de la souche *O. maius* Zn ; et (ii) le criblage d'une banque d'ADNc d'*O. maius* Zn par la méthode de complémentation fonctionnelle de souches mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Les mutants d'*O. maius* ont été obtenus à partir de transformations de conidies de la souche *O. maius* Zn afin de définir la fonction de gènes spécifiques impliqués dans le mécanisme de tolérance. Ces mutants ont été testés pour leur sensibilité au zinc et au cadmium. Parmi les 210 mutants criblés jusqu'à présent, deux présentent au niveau phénotypique une sensibilité au zinc plus élevée que celle de la souche sauvage. L'analyse moléculaire par TAIL-PCR des mutants a révélé qu'un des deux gènes mutés code une protéine appartenant à la superfamille « FAD/NAD(P)-binding Rossmann fold ». D'autres études de caractérisation fonctionnelle telles que la quantification et la localisation subcellulaire des métaux accumulés sont prévues. Le criblage d'une banque d'ADNc de la souche *O. maius* Zn, par complémentation fonctionnelle des levures mutantes de *S. cerevisiae* Δ*Zrc1* (sensible au Zn) et Δ*Ycf1* (sensible au Cd), a également été effectué. Deux gènes ont ainsi été identifiés par complémentation de la souche Δ*Zrc1*: (1) un transporteur de fer de faible affinité, qui pourrait présenter un intérêt du fait que la littérature ait déjà décrit une minutieuse coordination entre le métabolisme du fer et du zinc ; et (2) un membre de la famille des transporteurs CDF (Cation Diffusion Facilitator) qui sont impliqués dans le transport des métaux. La complémentation de la souche Δ*Ycf1* a révélé 2 gènes candidats : un gène de fonction inconnue appartenant à la famille DUF614 et un gène codant une chaperone Hsp70. Des études plus approfondies sont actuellement poursuivies pour évaluer la spécificité de la tolérance aux métaux et caractériser au niveau fonctionnel les gènes sélectionnés (délétion ciblée des gènes et localisation subcellulaire des protéines).

*Mots-clés :* champignon éricoïde, mécanismes de tolérance, métaux lourds

**Poster n°4.13**

# La phytoalexine '6-méthoxymelléine' est-elle impliquée dans les mécanismes de résistance de la carotte à *Alternaria dauci*, agent de la brûlure foliaire ?

**M. Lecomte** (1), C. Boedo (2), S. Bersihand (2), L. Hamama (1), A. Joubert (2), B. Calmes (2), V. Le Clerc (1), P. Hudhomme (3), P. Poupard (2), M. Briard (1), P. Simoneau (2), R. Berruyer (4)

(1) IFR Quasav 149, UMR GenHort A1259, AGROCAMPUS OUEST Centre d'Angers – INHP, 2 rue Le Nôtre, 49045 Angers cedex 01
(2) IFR Quasav 149, UMR PaVé A77, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 bd Lavoisier 49045 Angers cedex 01
(3) UMR CNRS CIMA 6200, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 bd Lavoisier 49045 Angers cedex 01
(4) IFR Quasav 149, UMR GenHort A1259, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 bd Lavoisier 49045 Angers cedex 01

La carotte produit une phytoalexine, la 6-méthoxymelléine (6-MM), lorsqu'elle est en présence de champignons pathogènes (Fan *et al.* 2000, Mercier *et al.* 2000). Ce travail a pour objectif de mieux cerner les liens éventuels entre, d'une part, la production de 6-MM et les variations quantitatives existant chez la carotte en terme de résistance à *A. dauci* et, d'autre part, la sensibilité du champignon à cette phytoalexine et le niveau d'agressivité du pathogène. L'évolution de la concentration en 6-MM a été mesurée par HPLC dans les feuilles de deux cultivars de carotte (Presto, sensible et Boléro, partiellement résistant) après inoculation par la souche de référence P2 d'*A. dauci.* Un pic de production de 6-MM est observé chez les deux variétés 11 jours après inoculation. Au niveau de ce pic, la concentration en 6-MM est 4 fois plus importante chez Boléro que chez Presto. Deux méthodes (microscopie, néphélométrie) ont été utilisées pour mesurer la résistance *in vitro* de deux souches à la 6-MM : la souche de référence P2, et une souche moins agressive, 10631. En termes de germination conidienne, une CI50 significativement plus élevée a été observée chez la souche P2 (1,9 mM) comparativement à la souche 10631 (0,9 mM), laquelle est du même niveau de sensibilité qu'une souche d'*A. brassicicola*, pathogène de Brassicacées. En termes de croissance mycélienne mesurée par néphélométrie, aucune différence significative n'a été observée entre les deux souches d'*A. dauci* (CI50 = 0,4 mM), alors qu'*A. brassicicola* demeure plus sensible à la 6-MM (0,15 mM). Les résultats suggèrent qu'un lien pourrait exister entre la sensibilité à la 6-MM et le caractère moins agressif d'*A. dauci* et que la 6-MM pourrait aussi être impliquée dans des mécanismes de résistance non-hôte. Les concentrations en 6-MM mesurées *in planta* sont inférieures aux valeurs de CI50 obtenues *in vitro*. L'induction de la synthèse de la 6-MM, bien que significativement plus importante chez le cultivar partiellement résistant par rapport au cultivar sensible, intervient tardivement après l'inoculation. La 6-MM ne serait donc pas impliquée dans les premières phases des mécanismes de résistance de la carotte à *A. dauci*.

(1) Fan *et al.* (2000) Biosynthesis of phytoalexin carrot root requires ethylene action. *Physiologia plantarum* 110: 450-454.
(2) Mercier *et al.* (2000) Systemic and local responses associated with UV- and pathogen-induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology* 90: 981-986.

**Poster n°4.14**

# Régulation de la production de trichothécènes B par le pH chez *Fusarium graminearum* : Pac1, un nouveau régulateur des gènes TRI.

**J. Merhej**, L. Pinson-Gadais, F. Richard-Forget, C. Barreau.

MycSA INRA UR1264 Bordeaux, BP81 33883 Villenave d'Ornon cedex, France

L'infection des céréales et du maïs par le champignon filamenteux *Fusarium graminearum* conduit à la fusariose de l'épi. Celle-ci est généralement accompagnée d'une accumulation de mycotoxines de type trichothécènes B dans les grains récoltés (1). Les gènes *TRI* regroupés en majorité dans le « cluster TRI » sont responsables de la biosynthèse de ces trichothécènes B. Ils sont bien décryptés mais les connaissances de base sur leur régulation restent encore trop restreintes. Ces gènes sont exprimés quatre jours après l'infection de l'épi. *In vitro*, en milieu synthétique, ils sont induits dès le 3ème jour de culture et la toxine commence à s'accumuler le jour suivant. Le développement du champignon et la production de trichothécènes B sont toujours concomitants avec une chute du pH dans le milieu de culture. Cette acidification est déterminante pour l'expression des gènes *TRI* conduisant à l'accumulation de la toxine. En effet, la neutralisation du milieu de culture par rajout de tampon après la chute du pH déclenche une répression de l'expression des gènes *TRI* bloquant ainsi la production de toxine. Le facteur de transcription PAC impliqué dans le contrôle de l'homéostasie du pH chez les champignons régule aussi la biosynthèse d'un grand nombre de métabolites secondaires (2). Pour étudier son rôle potentiel dans la régulation des gènes *TRI* chez *F. graminearum*, une souche *Fg*Δ*Pac1* portant une délétion du gène *Pac1* et une souche recombinante *FgPac1c* exprimant constitutivement la forme mature de PAC1 ont été construites. L'expression forcée de PAC1 mature réprime l'expression des gènes *TRI* et réduit fortement l'accumulation de la toxine à pH acide. Par contre, la délétion de *Pac1* ne permet pas une expression des gènes *TRI* à pH neutre, cependant, elle provoque une induction précoce de leur expression et de l'accumulation de la toxine à pH acide. Ces résultats suggèrent que PAC1, dans sa forme active, est un répresseur de l'expression des gènes *TRI*, mais n'est pas le seul acteur à pH neutre. Afin d'identifier les différentes voies de régulation sous le contrôle de PAC1 et de comprendre leurs interactions avec les voies de régulation de la mycotoxinogenèse, l'analyse du transcriptome des souches recombinantes et sauvage en milieu acide ou neutre a été réalisée.

(1) Goswami RS, Kistler HC. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant. Pathol. 5: 515-25.
(2) Arst HN, Peñalva MA. 2003. pH regulation in Aspergillus and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. Trends Genet. 19(4): 224-31.

*Mots-clés : Fusarium graminearum,* trichothécènes B, gènes *TRI*, pH, *Pac1*.

# Identification of new MAMPs from the *Aphanomyces euteiches* cell wall

**A. Nars**, C. Lafitte, I. Badreddine, L. Heux, J.-J. Bono, B. Dumas, J. Fliegmann, A. Bottin

Université de Toulouse, UMR5546 UPS-CNRS, 24 chemin de Borde-Rouge, BP42617, 31326 Castanet-Tolosan

Plant immunity can be activated through the perception of signals called Microbial-Associated Molecular Patterns (MAMPs), such as chitin fragments originating from the fungal cell wall. Chitin fragments are recognized by a family of plant receptors containing LysM domains. In legumes, LysM receptors are also involved in the perception of Nod factors which are lipochitooligosacchrides produced by symbiotic bacteria (Knogge and Scheel, 2006). Oomycetes are cellulosic microorganisms which usually lack chitin in their cell walls, but contain glucan-derived MAMPs such as the beta-1,3-1,6-glucan elicitor from *Phytophthora* that induces immune responses in legumes (Cote *et al.* 2000). The saprolegniale *Aphanomyces euteiches* is a major legume parasite, which is pathogenic on the model plant *Medicago truncatula*. Analysis of the *A. euteiches* cell wall monosaccharide composition showed the presence not only of glucose, but also of ca. 10% N-acetylglucosamine. Interestingly, the latter compound is not present as crystalline chitin, but as amorphous chitosaccharides which constitute structural as well as exposed surface polysaccharides (Badreddine *et al.* 2008). The presence of both, glucans and chitosaccharides, in *A. euteiches* cell walls suggests that they may contain multiple MAMPs. The work described consisted in the purification and structural characterization of glucan and chitosaccharide MAMP fragments from *A. euteiches* cell walls. Subsequently, their biological activity was analyzed by transcriptomic analyses in elicited *M. truncatula* seedlings. Further analysis of hormone and secondary metabolite measurements is being done to assess defense activation. A second part of this work will consist in the identification of the genes involved in the perception of the chitosaccharide compounds. As part of an ANR project deciphering the mechanisms of perception of pathogenic or symbiotic chitooligosaccharide signals in *M. truncatula*, LysM-RLK candidate gene mutants will be screened using a bioassay based on the measurement of extracellular reactive oxygen species produced in response to treatment by the *A. euteiches* chitosaccharides (ANR-blanche « Sympasignal », 2009-2012). This study will provide insights into recognition and defence events involved in legume-microorganism interactions and possible links between symbiotic and pathogenic signal perception. Preliminary data and ongoing studies will be presented.

(1) Badreddine, I., Lafitte, C., Heux, L., Skandalis, N., Spanou, Z., Martinez, Y., Esquerre-Tugaye, M.T., Bulone, V., Dumas, B. and Bottin, A. (2008) Cell wall chitosaccharides are essential components and exposed patterns of the phytopathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. Eukaryot Cell, 7, 1980-1993.

(2) Cote, F., Roberts, K.A. and Hahn, M.G. (2000) Identification of high-affinity binding sites for the hepta-beta-glucoside elicitor in membranes of the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. Planta, 211, 596-605.

(3) Knogge, W. and Scheel, D. (2006) LysM receptors recognize friend and foe. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 10829-10830.

*Keywords: Aphanomyces*, chitin, lysM, legumes

**Poster n°4.16**

# Analyse phylogénétique de familles de gènes codant des Thaumatin-Like Proteins et régulation transcriptionnelle chez le Peuplier lors de l'interaction avec le pathogène *Melampsora larici-populina*

**B. Pêtre**, S. Duplessis

UMR 1136 INRA/Nancy Université, Interactions Arbres - Microorganismes, Equipe Ecogénomique des interactions, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux

Les plantes sont continuellement exposées à des microorganismes pathogènes. Cependant, la maladie est une exception et la résistance reste la règle. Cela est notamment rendu possible par l'expression de protéines de défense (enzymes ou peptides) qui présentent de fortes activités antimicrobiennes. Chez les plantes, ces protéines appelées protéines PR pour Pathogenesis-Related, sont actuellement regroupées au sein de 17 classes (PR-1 à PR-17). La classe des PR-5 est constituée des Thaumatin-Like Proteins (TLPs), qui en plus d'être connues pour leur pouvoir édulcorant et leur potentiel allergène, présentent une forte activité antimicrobienne. Un total de 59 TLPs ont été identifiées dans le génome du Peuplier *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.,* 2006), ce qui représente une augmentation significative du nombre de TLPs par rapport aux plantes annuelles. Différentes analyses du transcriptome ont montré une forte accumulation de transcrits de TLPs dans les feuilles de Peuplier infectées par des champignons du genre *Melampsora* (Duplessis *et al.,* 2009). Nous avons réalisé l'analyse phylogénétique des TLPs en utilisant les séquences de 7 plantes dont le génome a été séquencé (199 TLPs) et les séquences disponibles dans les bases de données protéiques internationales (324 TLPs). Cela nous a permis d'identifier des clades spécifiques largement enrichis en TLPs de Peuplier vraisemblablement suite a des évènements récents de duplication, ainsi que des clades spécifiques de monocotylédones (small-TLPs), d'animaux, de champignons ascomycètes et basidiomycètes ou encore de bactéries. L'annotation experte des TLPs de *P. trichocarpa* a permis de valider 49 des 59 modèles de gènes initialement prédits, et 5 d'entre eux présentent un domaine kinase immédiat en aval du domaine TLP. L'annotation de ces gènes révèle une organisation protéique singulière déjà rapportée chez *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.,* 1996), avec un module TLP extracellulaire suivi d'un domaine transmembranaire et d'un module serine/thréonine kinase intracellulaire. Le séquencage d'ADNc devrait permettre de vérifier l'organisation exacte des gènes TLP-STK chez le Peuplier. Enfin, l'analyse des profils d'expression géniques chez le Peuplier lors d'interactions compatibles et incompatibles avec *M. larici-populina* confirme le rôle clef de certaines TLPs lors des étapes précoces d'interaction, permettant la mise en place d'une résistance hôte-spécifique efficace contre la rouille.

(1) Tuskan *et al.* 2006. The genome of black cottonwook, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science. 313:1596-1604.
(2) Duplessis *et al.* 2009. Poplar and pathogen interactions: insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. Critical Reviews in Plant Science. 28:309-334.
(3) Wang *et al.* 1996. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. Proceedings of the National Academy of Science. 93 :2598-2602.

*Mots-clés :* PR-protein, Thaumatine, RT-qPCR

# Analyse des déhydrines chez le champignon phytopathogène *Alternaria brassicicola*

**S. Pochon**, P. Simoneau, E. Jaspard , T. Guillemette

UMR A77 Pathologie Végétale, Equipe « Complexes Fongiques Nécrotrophes », 2 boulevard Lavoisier, Université d'Angers.
UMR PMS, 2 boulevard Lavoisier, Université Angers.

La transmission par les semences est une étape critique du cycle de vie du champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola*, pathogène des plantes de la famille des Brassicaceae. Bien qu'*Arabidopsis thaliana* et *Alternaria brassicicola* constituent un pathosystème modèle pour l'étude des interactions nécrotrophes, les mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la contamination de la graine puis l'infection de la plantule sont largement méconnus. Un de ces mécanismes pourrait nécessiter la mise en place, chez *A. brassicicola,* d'une adaptation face aux faibles teneurs en eau de la graine. Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), famille protéique bien décrite chez les végétaux, sont régulièrement associées à la tolérance à la dessiccation (semences) et au stress hydrique (organes végétatifs). Une classe particulière de protéines de la famille des LEA, les déhydrines, a été mise en évidence pour la première fois chez le champignon ectomycorrhizien *Tuber borchii* en lien avec la déshydratation cellulaire (Abba *et al.*, 2006). L'étude bioinformatique du protéome d'*A. brassicicola* nous a permis d'identifier trois déhydrines potentielles (AbDHN1, AbDHN2 et AbDHN3). L'analyse de leurs propriétés physico-chimiques (composition en acides aminés, profil d'hydrophilie, séquence consensus, …) confirme leur appartenance à cette famille protéique. Les profils d'expression, réalisés en conditions de stress osmotique, révèlent une induction de l'expression des trois gènes *Abdhn1* à *Abdhn3*. De plus, une analyse fonctionnelle a été entreprise par l'obtention d'un mutant nul pour le gène *abdhn1,* par mutagénèse dirigée. Le phénotypage de ce mutant dans diverses conditions de stress n'a pas permis de relier la mutation à un phénotype particulier par rapport à la souche sauvage, mis à part une sensibilité accrue du mutant face à un stress hydrique créé par du PEG. Cette absence de phénotype marqué est probablement due à une redondance fonctionnelle entre les trois déhydrines. Cette hypothèse devra être testée à court terme par l'obtention et la caractérisation d'un double mutant pour les gènes *abdhn1* et *abdhn2* qui présentent des profils d'expression similaires.

*Mots clés : Alternaria brassicicola,* déhydrines, stress hydrique, transmission aux semences, mutagénèse dirigée.

**Poster n°4.18**

# GRP-CD cell wall proteins in plant kingdom and their involvement in plant resistance to *Phytophthora parasitica* in tobacco

**M. Ponchet** (1), S. Fourré (1), A. Marais (1), K. Elmorjani (2), C. Moro (1), B. Industri (1), G. Arbiol (1) C. Mura (1), D. Marion (2), E. Galiana (1)

(1) UMR Interactions Biotiques et Santé Végétale (INRA, CNRS, UNSA), F-06903 Sophia Antipolis, France
(2) INRA, U BIA, F-44316 Nantes Cedex3

Glycine Rich Proteins « with a » Cysteine Domain (GRP-CD) are secreted plant proteins linked to the cell wall, particularly in xylem tissues1. We first focus on their repartition in *Viridiplanta*e by analysing the transcripts of up to 125 species. These proteins occurred with seed plants. However, their repartition is quite surprising since they could be highly expressed in some species while completely absent from other ones. This particular feature could not be connected to taxonomy. A functional analysis of this multigenic family was achieved in tobacco by gene silencing whilst a recombinant protein and a polyclonal antibody were obtained. The main results obtained are: (i) silencing does not affect plant development (ii) silencing clearly impairs basal and systemic acquired resistance to *Phytophthora parasitica* (iii) SA pathway is not controlled by these proteins in *Nicotiana* as it was shown for *Arabidopsis*2 (iv) these proteins drastically inhibit *P. parasitica* germination and growth and they are strongly adsorbed on cellulose (v) these proteins are not polymerised via peroxidase/H2O2 as it was already described for GRP3 despite a high content in Tyr residues. The effect of GRP-CD silencing on other pathogens as well as the ability of these proteins to bind to different plant and pathogen wall polysaccharides is in progress. This study points out the role of GRP-CD in plant resistance to pathogens and their functional divergence between *Nicotiana* and *Arabidopsis*. Among plants expressing GRP-CD, the heritability of these genes should be further considered in plant breeding for sustainable agriculture. From the evolutionary point of view, this work raises the question of independent apparition or loss of GRP-CD genes in plant kingdom.

(1) Domingo, C., Sauri, A., Mansilla, E., Conejero, V., and Vera, P. (1999). Plant J. 20, 563-570.
(2) Park, A. R., Cho, S. K., Yun, U. J., Jin, M. Y., Lee, S. H., Sachetto-Martins, G., and Park, O. K. (2001). J. Biol. Chem. 276, 26688-26693.
(3) Ringli, C., Hauf, G., and Keller, B. (2001). Plant Physiol. 125, 673-682.

*Keywords:* Resistance Cell Wall, Glycin, Rich Protein, Oomycete

**Poster n°4.19**

# A transcriptional analysis of rice leaves infected by *Magnaporthe grisea* provides new insights on the role of the fungal secretome and of chromatin remodelling in pathogenicity

**J. Vallet** (1), M.-J. Gagey (1) , D. Vincent (3), C. Ribot (2), C. Job (1), D. Job (1), C. Plomion (3), R. Beffa (2), M.-H Lebrun (1).

(1) UMR MAP, CNRS, Lyon, France
(2) BayerCropScience, Lyon, France
(3) INRA, Pierroton, France

Using Agilent microarrays, we performed a transcriptional analysis of rice leaves infected by *M. grisea* (5 days after inoculation) to identify 1851 genes expressed during infection, 244 being specific. These infection specific genes mainly encode secreted proteins (40%) as well as a small group of chromatin remodelling proteins. To test that chromatin remodelling is important for infection, we deleted the four *M. grisea* histone deacetylases. Two mutants are reduced in pathogenicity while another fully non pathogenic. Since *M. grisea* secretes a large number of proteins during infection, we developed a proteomic analysis of its secretome. Using 2D and 1D gel electrophoresis, we identified 221 proteins from in vitro culture filtrates including 135 proteins with signal peptides. 40% of these proteins are expressed during infection. Among the 38 small secreted proteins identified, 15 are expressed during infection (38%) and are candidate effectors. They will be studied in the in vitro secretome for their effect on rice (IRMA project) and their role in infection.

*Keywords:* transcriptional analysis, infection, secretome, secreted proteins, candidate effectors

**Poster n°4.20**

# La cassiicoline, seul facteur de virulence de *C. cassiicola* chez l'hévéa ?

**M. Déon (1)**, D. Bieysse (2), A. Berger (3), T. Leroy (3), P. Roeckel-Drevet (4), V. Pujade-Renaud (1)

(1) CIRAD UMR-DAP, Université Blaise Pascal, laboratoire PIAF, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière
(2) CIRAD UMR-BGPI, TA 41/K, Campus Internationnal de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5
(3) CIRAD UMR-DAP, TA A96/03, Avenue Agropolis, 34398 cedex 5
(4) Université Blaise Pascal, UMR-PIAF, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière.

*Corynespora cassiicola* est un champignon ascomycète affectant une très large gamme d'espèces végétales. Chez l'hévéa, il provoque la maladie foliaire Corynespora Leaf Fall Disease (CLFD). Cette maladie qui touche principalement l'Asie et l'Afrique, principaux pays producteurs de latex, se manifeste par des épidémies sporadiques très sévères entrainant alors l'arrachage des clones d'hévéas les plus sensibles. Des travaux réalisés sur une souche des Philippines ont permis de mettre en évidence une toxine nommée cassiicoline qui est capable à elle seule de reproduire les symptômes de la maladie (Breton *et al*., 2000). C'est une petite protéine de 27 acides aminés stabilisée par 3 ponts disulfures avec un groupement sucré sur le 2$^{ème}$ acide aminés (Barthe *et al.*, 2007; de Lamotte *et al.*, 2007). C'est actuellement le seul facteur de virulence connu, responsable de la pathogénicité de *C. cassiicola* chez l'hévéa. Nous avons pu montrer que la cassiicoline dérive d'une protéine de plus grande taille la procassiicoline dont le gène a pu être cloné par PCR à l'aide d'amorces dégénérées. Afin de mieux comprendre les mécanismes de virulence de *C. cassiicola* chez l'hévéa, la détection par PCR du gène de procassiicoline a été réalisée sur une sélection de souches de différentes origines géographiques. Des southern blot nous ont permis ensuite de confirmer ou non la présence ou l'absence du gène dans ces isolats. Parallèlement, la phytotoxicité du filtrat de culture des ces souches a été testée sur feuilles détachées. Les analyses moléculaires couplées aux tests de phytotoxicité des filtrats de culture des différents isolats montrent que des filtrats de souches de *C. cassiicola* ne possédant pas le gène de procassiicoline ou alors un gène très divergent sont capables d'induire des symptômes. Nous démontrons ici que la cassiicoline ne serait pas le seul facteur de virulence de *C. cassiicola*.

(1) Barthe P, Pujade-Renaud V, Breton F, Gargani D, Thai R, Roumestand C, de Lamotte F (2007) Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. J Mol Biol 367: 89-101
(2) Breton F, Sanier C, d'Auzac J (2000) Role of Cassiicolin, a Host-Selective Toxin, in Pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, Causal Agent of a Leaf Fall Disease of Hevea. J. Rubb. Res. 3 (2): 115-128
(3) De Lamotte F, Duviau MP, Sanier C, Thai R, Poncet J, Bieysse D, Breton F, Pujade-Renaud V (2007) Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 849: 357-362