



HAL
open science

Rôle de la cassiicoline dans l'interaction compatible *Hevea brasiliensis* / *Corynespora cassiicola*: vers la sélection assistée par effecteur

Sébastien Ribeiro

► To cite this version:

Sébastien Ribeiro. Rôle de la cassiicoline dans l'interaction compatible *Hevea brasiliensis* / *Corynespora cassiicola*: vers la sélection assistée par effecteur. Biologie végétale. Université Clermont Auvergne, 2019. Français. NNT: . tel-02791380

HAL Id: tel-02791380

<https://hal.inrae.fr/tel-02791380v1>

Submitted on 5 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.

**Rôle de la cassiicoline dans l'interaction compatible
Hevea brasiliensis / Corynespora cassiicola: vers la
sélection assistée par effecteur: Biologie végétale**

Sebastien Ribeiro

► **To cite this version:**

Sebastien Ribeiro. Rôle de la cassiicoline dans l'interaction compatible Hevea brasiliensis / Corynespora cassiicola: vers la sélection assistée par effecteur: Biologie végétale. Génétique des plantes. Université Clermont Auvergne, 2019. Français. NNT: 2019CLFAC010 . tel-02275923

HAL Id: tel-02275923

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02275923>

Submitted on 2 Sep 2019

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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire

Par **RIBEIRO Sébastien**

**Rôle de la cassiicoline dans l'interaction compatible
Hevea brasiliensis / *Corynespora cassicola* :
vers la sélection assistée par effecteur**

Soutenue le 28/01/19, devant la commission d'examen.

DESPREZ-LOUSTAU Marie-Laure	DR INRA Bordeaux	Rapportrice
FUDAL Isabelle	CR INRA Grignon	Rapportrice
THARREAU Didier	DR CIRAD Montpellier	Rapporteur
BONHOMME Ludovic	MCF UCA Clermont-Ferrand	Examineur
LABEL Philippe	DR INRA Clermont-Ferrand	Examineur
PUJADE-RENAUD Valérie	CR CIRAD Montpellier	Directrice de thèse

Laboratoire de Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en
environnement Fluctuant (UMR_547 PIAF)



Cette étude a été co-financée par le Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), l'Institut Français du Caoutchouc (IFC), la Manufacture Française des Pneumatiques Michelin, la Société Internationale de Plantations d'Hévéa (SIPH) et la Société Financière des Caoutchoucs (SOCFIN).

Les travaux de cette étude ont été réalisés au sein de l'UMR de Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant (UMR_547 PIAF) à l'Université Clermont Auvergne de Clermont-Ferrand, en partenariat avec l'UMR AGAP (Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales) et les Sociétés de plantation membres de l'IFC citées ci-dessus.



REMERCIEMENTS

Avant de débiter ce manuscrit, je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet de thèse.

En premier lieu, je remercie l'Institut Français du Caoutchouc, les sociétés Michelin, SIPH et SOCFIN, et les directeurs des plantations SOGB et SAPH-Toupah en Côte d'Ivoire pour le financement et l'appui logistique apporté sur plantations, qui ont permis d'effectuer les recherches réalisées dans le cadre de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, Marie-Laure Desprez-Loustau, Isabelle Fudal, Didier Tharreau, Philippe Label et Ludovic Bonhomme, pour avoir accepté de lire et juger mes travaux.

Merci aux membres de mes deux comités de thèse, Jane Roche, Aurélie Gousset, Philippe Label, Ludovic Bonhomme, André Clément-Demange et Dominique Garcia pour leurs conseils avisés et leur disponibilité.

Un GRAND MERCI à ma directrice de thèse Valérie Pujade-Renaud pour avoir été une encadrante si exceptionnelle. La confiance qu'elle m'a témoignée m'a permis d'aborder cette thèse avec enthousiasme. Elle m'a apporté beaucoup de soutien lors de ces trois années de thèse et m'a permis d'améliorer ma pratique, ma rigueur et mes connaissances. Merci pour sa gentillesse et sa disponibilité permanente.

Je remercie l'équipe de direction du PIAF composée de Jean-Louis Julien, Bruno Moulia, Valérie Legué, Hervé Cochard et Nicolas Dones de m'avoir si bien accueilli au sein du laboratoire. Merci pour leur professionnalisme et leur bonne humeur.

Je remercie tous ceux qui m'ont été d'une aide inestimable pendant ma thèse. Je pense notamment à Jérôme Franchel, David Lopez, Gisèle Bronner, Caroline Savel, Nicole Brunel, Céline Sac, Sylvaine Labernia, Christelle Boisselet et Brigitte Girard pour leur aide technique, leur gentillesse et leurs conseils. Merci à Philippe Label pour sa pédagogie exemplaire et pour sa patience. J'ai beaucoup appris à ses côtés. Merci à Mélanie Décourteix et Aurélie Gousset qui ont rendu les déjeuners très animés, notamment lorsque l'on était amené à parler de Vigo Mortenssen. Merci à Nathalie Leblanc-Fournier, qui a été mon encadrante de stage de Master 2 et qui m'a permis d'obtenir de solides bases en biologie moléculaire. Merci à Sandrine Meyniel d'avoir été si patiente avec moi lorsque je rentrais dans son bureau pour demander des choses à la dernière minute.

Merci à tous les membres du PIAF pour leur sympathie, leur bonne humeur mais aussi pour leur professionnalisme et leurs conseils avisés. Merci à Catherine Lenne, Patricia Drevet, Philippe Malagoli, Stéphane Herbette, Boris Fumanal et Jean-Stephane Venisse. J'ai beaucoup appris à vos côtés, que ce soit au sein du PIAF que lors des cours passionnants et vivants que certains m'ont délivré durant tout mon cursus universitaire. Merci à Marc Saudreau et à toutes l'équipe MEA pour le climat chaleureux qui règne lors des réunions d'équipe.

Merci à tous les thésards et post-doc avec qui j'ai partagé des bières et parfois des galères. Merci à Jeanne Roignant, Juliette Roué, Marie Garavillon-Tournayre, Lise-Marie Billon, Lia Lamacque, Cédric Lemaire, Romain Baffoin, Marine Fernandez, Benjamin Niez. Merci à mon ami Titouan Bonnot, qui vit aujourd'hui le rêve américain, d'avoir été si important pour moi dans les premiers moments de ma thèse. Merci pour tous ces moments indispensables passé à la salle de sport où l'on a sué mais surtout déliré (3% body-fat). Merci à Lise Pomiès pour nos discussions animées autour des films et des séries en tout genre (même si on n'était pas toujours d'accord !). Merci à Kévin Tocquard pour ta franchise et nos délires (toc toc ! Qui est là ? Mozart ! Mozart qui ? Mozart-me citoyen, Formez vos bataillons !). Merci à Ludovic Martin (1^{er} prix Bravo !) pour sa joie de vivre et son capital sympathie (salut !). Sa côte de popularité n'a jamais cessé de me surprendre depuis toutes ces années.

Je tiens également à remercier tous les membres du GDEC pour m'avoir accepté au sein de leur laboratoire quand je cherchais des réponses sur le double hybride. Merci notamment Monique Sibaud et à Jane Roche pour leur extrême gentillesse et pour m'avoir tant aidé lors de ma thèse.

Merci à Floriane Perret (bientôt Floriane Ribeiro), ma plus belle rencontre, mon rayon de soleil quotidien, mon pilier dans la vie. Merci pour m'avoir soutenu (et supporté) tout au long de cette thèse.

RÉSUMÉ

L'hévéa (*Hevea brasiliensis*) est la seule source de caoutchouc naturel commercialisé à travers le monde. En Afrique et en Asie, la maladie 'Corynespora Leaf Fall' (CLF), causée par le champignon nécrotrophe *Corynespora cassiicola*, affecte les plantations hévéicoles en provoquant des défoliations massives sur les clones les plus sensibles. L'évaluation précoce de la sensibilité des clones dans les programmes de sélection est un enjeu majeur pour écarter les individus les plus sensibles des programmes de développement et ainsi réduire la pression de la maladie. Une des méthodes d'évaluation envisagée consiste à tester indirectement la sensibilité des clones aux effecteurs fongiques responsables de la virulence (**test toxinique**). Parmi tous les effecteurs potentiels du champignon identifiés *in silico*, seule la **cassiicoline Cas1** a été purifiée et caractérisée à ce jour. Il s'agit d'une petite glycoprotéine sécrétée qui jouerait un rôle dans les phases précoces de l'infection en induisant la nécrose des tissus. Les souches porteuses du gène *Cas1* sont parmi les plus agressives sur les clones d'hévéa testés. Néanmoins, certaines souches de *C. cassiicola* ne produisant pas de cassiicoline présentent tout de même une agressivité modérée, suggérant l'implication d'autres effecteurs dans l'établissement de la maladie CLF.

Les **objectifs** de cette thèse sont (i) de déterminer si la sensibilité à la cassiicoline Cas1 est un critère de sélection pertinent pour identifier les clones d'hévéa les plus sensibles à la maladie CLF, et (ii) d'identifier chez l'hévéa des facteurs de sensibilité à la cassiicoline Cas1.

Nous avons d'abord analysé l'inoculum naturel et montré que les souches porteuses du gène *Cas1* représentent un quart de la population de *C. cassiicola* dans les plantations d'hévéa d'Afrique de l'Ouest, le reste étant majoritairement constitué de souches dépourvues du gène codant la cassiicoline (Type A/Cas0). Nous avons ensuite créé un mutant de délétion du gène *Cas1* pour la souche de référence CCP et comparé sa virulence à celle de la souche sauvage. Nous avons ainsi pu montrer que la cassiicoline Cas1 est bien un effecteur de nécrotrophie déterminant pour la virulence de *C. cassiicola* chez l'hévéa puisque la souche délétée perd toute virulence sur les clones testés. Enfin, nous avons recherché chez l'hévéa des facteurs de sensibilité à la cassiicoline Cas1 à travers deux approches. La technique de "double hybride en levures" nous a permis d'identifier une trentaine de protéines candidates qui pourraient interagir physiquement avec la toxine. Une approche transcriptomique, nous a permis d'identifier les gènes d'hévéa dont l'expression est modifiée suite à l'application de la cassiicoline purifiée, en comparant un clone sensible (PB260) et un clone tolérant (RRIM600).

En **conclusion**, ces travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction compatible entre *C. cassiicola* et l'hévéa et ouvrent la voie de la **sélection assistée par effecteur**.

Mots clés : *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, CLF, cassiicoline, effecteur, test toxinique, diversité, mutant de délétion, facteurs de sensibilité.

ABSTRACT

The **rubber tree** (*Hevea brasiliensis*) is the primary commercial source of natural rubber worldwide. In Asia and Africa, *H. brasiliensis* is affected by the *Corynespora* leaf fall (CLF) disease, caused by the broad-spectrum necrotrophic fungus *Corynespora cassiicola*. During severe attacks, massive fall of young leaves can occur in susceptible cultivars. Early evaluation of the susceptibility of rubber clones in breeding programs is required to avoid developing highly susceptible clones that would amplify the disease. An indirect phenotyping procedure envisaged consists in testing the sensitivity to the fungal toxins (or effectors) rather than the susceptibility to the fungus itself (**toxin test**). Among all putative effectors identified *in silico*, only **cassiicolin Cas1** has been purified and characterized to date. This small secreted glycoprotein was for long suspected to play a role in the early phase of infection by inducing tissue necrosis. Strains carrying the *Cas1* gene are the most aggressive on tested rubber clones. However, strains without cassiicolin gene (called Cas0) still show moderate aggressiveness, suggesting the existence of effectors other than cassiicolin.

The **objectives** of this study are (i) to determine if susceptibility to cassiicolin Cas1 is a relevant selection criterion to eliminate the rubber clones most susceptible to CLF disease, and (ii) identify molecular factors involved in the sensitivity to Cas1, in rubber tree.

We have thus analyzed the typology of a large set of *C. cassiicola* isolates collected from various rubber plantations in West Africa. Our results show that isolates carrying the cassiicolin isoform Cas1 are widely represented, but that the most represented type (A/Cas0) are isolates without cassiicolin gene. Here we show that deletion of the cassiicolin gene in the isolate CCP resulted in a total loss of virulence. This clearly demonstrated that cassiicolin is indeed a necrotrophic effector required for the virulence of isolate CCP in rubber tree. Finally, we have investigated susceptibility factors to cassiicolin Cas1 on rubber tree with two different approaches. We identified about thirty candidate proteins that could physically interact with the toxin, through the two-hybrid assay. A transcriptomic approach allowed us to identify the rubber genes differentially expressed in response to the purified cassiicolin, comparing a susceptible clone (PB260) and a tolerant clone (RRIM600).

In **conclusion**, we think that the necrotrophic effector Cas1 can be an interesting tool for effector-based selection of tolerant clones for African plantations; however, efforts should also be placed on A/Cas0 isolates, in order to identify potential necrotrophic effector(s) responsible for their virulence. This would enlarge the potential of **effector-based selection**.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, CLF, cassiicolin, effector, toxic test, diversity, deletion mutant, susceptibility factor.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	i
LISTE DES FIGURES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ANNEXES	vii

INTRODUCTION 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....3

1. Les interactions entre les plantes et les agents pathogènes fongiques	5
1.1. Les modes de vie des champignons	5
1.2. Infection des plantes par des champignons pathogènes	6
1.3. L'immunité des plantes face aux pathogènes fongiques	8
1.3.1. L'activation de la PTI par les PAMPs, MAMPs ou DAMPs	9
1.3.2. Immunité et sensibilité déclenchées par les effecteurs.....	12
1.3.2.1. Effecteurs biotrophes et gènes de résistance	13
1.3.2.2. Effecteurs nécrotrophes et gènes de sensibilité	17
2. Le patho-système <i>Hevea brasiliensis/Corynespora cassiicola</i>	19
2.1. <i>Hevea brasiliensis</i>	19
2.1.1. Description botanique.....	19
2.1.2. Hévéaculture.....	21
2.1.2.1. Domestication de l'hévéa.....	21
2.1.2.2. La production et consommation de caoutchouc naturel.....	22
2.1.2.3. Utilisations du caoutchouc naturel	24
2.1.3. Physiologie de la production de caoutchouc naturel	25
2.1.4. Maladies foliaires de l'hévéa causées par des champignons	27
2.1.5. Méthodes de lutte contre les maladies fongiques	29
2.2. <i>Corynespora cassiicola</i>.....	31
2.2.1. Description générale.....	31
2.2.2. Bref historique de la maladie CLF chez l'hévéa.....	33
2.2.3. Diversité des souches de <i>Corynespora cassiicola</i>	35
2.2.4. Les effecteurs de <i>Corynespora cassiicola</i>	39
2.2.4.1. Historique de la découverte de la cassiicoline Cas1.....	39
2.2.4.2. Diversité des gènes codant la cassiicoline	42
2.2.4.3. Virulence des souches porteuses de l'isoforme Cas1	44
2.2.4.4. Autres effecteurs de <i>C. cassiicola</i>	46
2.3. Les méthodes de sélection pour la sensibilité/tolérance à <i>C. cassiicola</i>	49
2.3.1. Observations des symptômes en plantations	49
2.3.2. Inoculation en conditions contrôlées	49
2.3.3. Sélection assistée par les effecteurs fongiques	50

OBJECTIFS DE THÈSE53

CHAPITRE 159

Etude de l'inoculum naturel fongique en Afrique de l'Ouest

1. Contexte d'étude et objectifs	61
2. Matériels et méthodes	62
2.1. Matériel biologique	62
2.2. Isolement mycélien et caractérisation moléculaire des souches	62
2.3. Diagnostic moléculaire par qPCR.....	63
2.4. Analyses phylogénétiques des souches de <i>C. cassiicola</i>	65
2.5. Expression du gène <i>Cas1</i> par PCR quantitative en temps réel (qPCR)	66
3. Résultats	67
3.1. Diversité de l'inoculum naturel fongique en Afrique de l'ouest.....	67
3.1.1. Genres fongiques associés aux nécroses foliaires (feuilles malades)	67
3.1.2. Genres fongiques associés aux feuilles saines.....	70
3.2. Méthode de diagnostic moléculaire des maladies CLF et anthracnose	72
3.2.1. Détection de <i>C. cassiicola</i> et de <i>Colletotrichum</i> dans des feuilles d'hévéas malades selon la méthode 1 (prélèvement feuille entière)	73
3.2.2. Comparaison de feuilles saines et malades selon la méthode 1 (prélèvement feuille entière)..	77
3.2.3. Détection de <i>C. cassiicola</i> et de <i>Colletotrichum</i> dans des feuilles d'hévéas malades selon la méthode 2 (séparation des parties nécrosées et des parties "vertes").....	78
3.3. Diversité des souches de <i>C. cassiicola</i> en Afrique de l'Ouest	80
3.3.1. Analyse phylogénétique basée sur quatre loci.....	80
3.3.2. Analyse phylogénétique basée sur les gènes de cassiicoline	85
3.3.3. Analyse d'expression du gène <i>Cas1</i> des souches appartenant aux clades A et C.....	87
4. Discussion.....	88
4.1. <i>Corynespora</i> et <i>Colletotrichum</i> sont étroitement associés	88
4.2. Typologie de la population de <i>C. cassiicola</i> en Afrique de l'Ouest.....	91

CHAPITRE 293

Etude d'un mutant de délétion du gène *Cas1*

1. Introduction	97
2. Materials and methods.....	99
2.1. Plant material	99
2.2. Fungal material.....	99
2.3. Construction of the <i>Cas1</i> gene replacement cassette.....	100
2.4. Transformation of <i>C. cassiicola</i> protoplasts.....	101
2.5. Verification of <i>Cas1</i> gene deletion.....	102
2.6. <i>Cas1</i> gene expression by real-time quantitative PCR	103
2.7. <i>In vitro</i> analysis of sporulation and germination rates	103
2.8. Virulence analysis of rubber tree leaves.....	104

2.9.	Complementation with exogenous cassiicolin	105
2.10.	ELM-based toxicity test	105
2.11.	Statistical analyses	106
3.	Results	106
3.1.	<i>Cas1</i> deletion in <i>Corynespora cassiicola</i> strain CCP	106
3.2.	<i>Cas1</i> gene expression in CCP wild-type and transformant strains	108
3.3.	Physiological comparison of CCP and <i>ccpΔcas1</i>	109
3.4.	Pathogenicity of <i>ccpΔcas1</i> mutant on detached rubber tree leaves	110
3.5.	Pathogenicity of <i>ccpΔcas1</i> mutant on non-detached leaves	113
3.6.	Complementation of <i>ccpΔcas1</i> with purified cassiicolin	114
3.7.	Compared toxicity of CCP and <i>ccpΔcas1</i> culture filtrates on eighteen rubber clones	115
3.8.	QTL associated with sensitivity of rubber tree to CCP and <i>ccpΔcas1</i> culture filtrates	118
4.	Discussion.....	120
4.1.	Cassiicolin <i>Cas1</i> is a necrotrophic effector required for the successful development of <i>C. cassiicola</i> strain CCP in the rubber tree	120
4.2.	Effectors other than cassiicolin	122
5.	Conclusions	124

CHAPITRE 3 126

Identification chez l'hévéa de facteurs de sensibilité à *Cas1*

1.	Contexte d'étude et objectifs	128
2.	Approche double hybride : identification des interacteurs potentiels de la cassiicoline <i>Cas1</i> chez le clone d'hévéa sensible PB260.....	130
2.1.	Principe général de la technique	130
2.2.	Matériel et méthodes	131
2.2.1.	Préparation des échantillons foliaires inoculés	131
2.2.2.	Souches de levures et de bactéries.....	131
2.2.3.	Vecteurs plasmidiques	132
2.2.4.	Préparation des acides nucléiques	133
2.2.5.	Construction de la banque d'ADNc hébergée dans la souche Y187	133
2.2.6.	Clonage de l'appât et tests d'auto-activation et de toxicité	135
2.2.7.	Fusion des souches Y187 et Y2HGGold ou 'mating'	137
2.2.8.	Présence des plasmides pGADT7-Rec et pGBKT7 dans les levures correspondantes.....	138
2.2.9.	Elimination des faux positifs par repiquages successifs	138
2.3.	Résultats	139
2.3.1.	Contrôle du bon déroulement de la technique de double hybride en levure	139
2.3.2.	Criblage de la banque ADNc PB260.....	141
2.3.3.	Identification des protéines proies interactrices.....	143
3.	Approche transcriptomique : identification des gènes d'hévéa dont l'expression est modifiée par la cassiicoline <i>Cas1</i> purifiée, comparativement chez PB260 (sensible) et RRIM600 (tolérant).....	148
3.1.	Matériel et méthodes	148
3.1.1.	Préparation des échantillons foliaires	148
3.1.2.	Extraction d'ARNs totaux et séquençage	149

3.1.3.	Nettoyage des données et ‘mapping’	149
3.1.4.	Analyse de l’expression différentielle des transcrits	150
3.1.5.	Annotation, ‘heatmap’ et enrichissement en ‘Gene Ontology’ (GO)	150
3.2.	Résultats	151
3.2.1.	Taux de ‘mapping’	151
3.2.2.	Dispersion des échantillons en fonction des variables.....	153
3.2.3.	Gènes différentiellement exprimés (GDEs) en réponse à la cassiicoline Cas1 purifiée	154
3.2.4.	Analyse de l’enrichissement ontologique des GDEs.....	157
3.2.4.1.	Enrichissement en GO sur les GDEs communs	157
3.2.4.2.	Enrichissement ontologique des GDEs spécifiques de chaque clone.....	160
3.2.5.	Analyse des GDEs codant des protéines de type récepteur	164
3.2.6.	Candidats double hybride différentiellement exprimés	166
4.	Discussion	168
4.1.	La cassiicoline Cas1 jouerait un rôle dans les phases précoces de l’infection en perturbant la PTI	168
4.2.	La cassiicoline Cas1 induit la NETS chez le clone sensible	171

CONCLUSION GENERALE.....176

PERSPECTIVES178

REFERENCES182

ANNEXES200

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aba : Auréobasidine A

ACP : Analyse en Composante Principale

AD : Activation Domain

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AGAP : Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales

AMP : Anti-Microbial Peptides

ANOVA : ANalysis Of Variance

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

Avr : Avirulence

CAZyme : Carbohydrate-Active enZyme

CC : Coiled Coil

CDS : CoDing Sequence

CIRAD : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

CLF : Corynespora Leaf Fall

CLS : Colletotrichum Leaf Spot

CWP : Cell Wall Protein

Cz : milieu Czapeck

DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns

DBD : DNA-Binding Domain

DTI : DAMP-Triggered Immunity

ELM : Electrolyte leakage measurment

ETI : Effector-Triggered Immunity

ETS : Effector-Triggered Susceptibility

FDR : False Discovery Rate

GDE : Gènes Différentiellement Exprimés

GO : Gene Ontology

HR : Hypersensitive Response

HSD : Honestly Significant Difference

HSP : Heat Shock Protein

HST : Host-Specific Toxin ou Host-Selective Toxin

IFC : Institut Français du Caoutchouc

IRRDB : International Rubber Research and Development Board

ITS : Internal Transcribed Spacer

LRR : Leucine-Rich Repeat

LTP : Lipid Transfer Protein
LysM : Lysin Motif
MAMP : Microbial-Associated Molecular Patterns
MAPK : Mitogen-Associated Proteins Kinases
MEA : Malt Extract Agar
MEB : Malt Extract Broth
NBS : Nucleotide-Binding Site
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NETS : Necrotrophic Effector-Triggered Susceptibility
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDA : potato dextrose agar
PIAF : Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant
PR : Pathogenesis-Related
PRR : Pattern Recognition Receptor
PTI : Pattern-Triggered Immunity
qPCR : PCR quantitative
QTL : Quantitative Trait Locus
RLK : Receptor-Like Kinase
RLP : Receptor-Like Protein
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SALB : South American Leaf Blight
SAPH : Société Africaine de Plantation d'Hévéa
SIPH : Société Internationale de Plantations d'Hévéa
SOCFIN : SOCiété FINAncière des caoutchoucs
SOGB : Société des caoutchoucs de Grand Béréby
SNP : Single-Nucleotide Polymorphism
SSP : Small Secreted Protein
TIR : Toll-Interleukin-1 Receptor
UTR : UnTranslated Regions

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Processus infectieux classique des champignons biotrophes et hémi-biotrophes	7
Figure 2 – Le modèle en zigzag illustrant le système immunitaire des plantes en réponse aux agents pathogènes biotrophes	8
Figure 3 – Exemples de couples PAMPs/PRRs	10
Figure 4 – Comparaison des interactions "gène-pour-gène" dans les patho-systèmes biotrophes (A) et nécrotrophes (B)	13
Figure 5 – Comparaison simplifiée des réponses de défense des plantes induites par la PTI et l'ETI face au pathogènes (modèle biotrophe)	14
Figure 6 – Interactions entre effecteurs et cibles, en systèmes biotrophes, h�mibiotrophes et nécrotrophes	14
Figure 7 – Différents modèles d'interaction entre protéines de résistances et effecteurs	16
Figure 8 – Stades foliaires de l'hévéa au cours du développement d'une unité de croissance	19
Figure 9 – L'hévéa, de l'arbre à la graine	20
Figure 10 – Production mondiale de caoutchouc naturel en 2017, d'après l'IRSG	23
Figure 11 – Superficie (en hectares) des cultures d'hévéa à travers le monde,	23
Figure 12 – Anatomie d'un tronc d'hévéa	25
Figure 13 – Récolte du latex de l'hévéa	27
Figure 14 – Symptômes foliaires provoqués par différents champignons pathogènes de l'hévéa	28
Figure 15 – Principaux symptômes de la maladie CLF chez l'hévéa	29
Figure 16 – Germination des spores de <i>C. cassiicola</i>	32
Figure 17 – Dynamique de la maladie CLF au cours d'une année sur une plantation d'hévéa, en Inde (Karnataka)	33
Figure 18 – Analyse phylogénétique des souches de <i>C. cassiicola</i> provenant d'hôtes et d'origines géographiques variés	36
Figure 19 – Effet du filtrat de culture de la souche CCP de <i>C. cassiicola</i> sur les feuilles de trois clones d'hévéa de sensibilité variable	39
Figure 20 – Corrélation entre la sensibilité des clones d'hévéas à la cassiicoline semi-purifiée et leur sensibilité aux spores de la souche CCP	40
Figure 21 – Structure tridimensionnelle de la cassiicoline, d'après Barthe <i>et al.</i> (2007)	41
Figure 22 – Effet de la cassiicoline purifiée sur l'ultrastructure cellulaire de l'hévéa	41
Figure 23 – Séquences protéiques des isoformes Cas1 � Cas7 de la cassiicoline	43
Figure 24 – Virulence de 18 isolats de <i>C. cassiicola</i> de classe toxinique variée, sur un clone d'hévéa sensible (PB217) et un clone tolérant (RRIM600)	45

Figure 25 – Analyse de l'expression du gène <i>Cas1</i> sur deux souches de <i>C. cassiicola</i> de type C/Cas1, après inoculation sur feuilles d'hévéas _____	45
Figure 26 – Méthodes de prélèvement des feuilles utilisées pour la mise au point du diagnostic moléculaire par qPCR. _____	64
Figure 27 – Proportion des genres les plus représentés dans les feuilles malades de différents clones d'hévéas provenant des plantations Bongo, Toupah et SOGB de Côte d'Ivoire (A), du Nigéria (Okumu), du Libéria (LAC) et du Ghana (GREL) (B). _____	69
Figure 28 – Proportion des genres <i>Colletotrichum</i> , <i>Corynespora</i> , <i>Diaporthe</i> , <i>Guignardia</i> , <i>Daldinia</i> et <i>Xylaria</i> isolés à différentes dates à partir de feuilles saines de différents clones d'hévéas provenant des plantations Bongo, Toupah/Ousrou et SOGB (Côte d'Ivoire). _____	71
Figure 29 – Détection de la présence de <i>C. cassiicola</i> et de <i>Colletotrichum</i> dans des feuilles malades d'hévéa (clone RRIM802) prélevées en Côte d'Ivoire (SOGB) _____	75
Figure 30 – Détection de la présence de <i>C. cassiicola</i> et de <i>Colletotrichum</i> dans des feuilles malades d'hévéa (clone RRIM921) prélevées en Côte d'Ivoire (SOGB) _____	76
Figure 31 – Détection par qPCR de la présence de <i>C. cassiicola</i> et de <i>Colletotrichum</i> dans des feuilles d'hévéa prélevées en Côte d'Ivoire en novembre 2017 _____	77
Figure 32 – Détection par qPCR de la présence de <i>C. cassiicola</i> et de <i>Colletotrichum</i> dans les parties nécrosées et "saines" des feuilles d'hévéa du clone IRCA18 prélevées en Côte d'Ivoire en mars 2017 _____	79
Figure 33 – Analyse phylogénétique de 316 de souches de <i>C. cassiicola</i> provenant d'hôtes et d'origines géographiques variées (Annexe 4). _____	84
Figure 34 – Analyse phylogénétique des gènes de cassiicoline de souches de <i>C. cassiicola</i> provenant d'hôtes et d'origines géographiques variées _____	87
Figure 35 – Analyse par qPCR de l'accumulation de transcrits du gène <i>Cas1</i> de souches de <i>C. cassiicola</i> cultivées in vitro _____	87
Figure 36 – Sévérité des maladies CLF et anthracnose (CLS) en fonction de la température maximale moyenne mensuelle et des précipitations, au cours de l'année 2009 _____	90
Figure 37 – Construction of the <i>Cas1</i> gene deletion cassette _____	101
Figure 38 – PCR analysis of the hygromycin-resistant transformants _____	107
Figure 39 – Detection of <i>Cas1</i> cDNA on 24-hr germinating spores of CCP and transformants 1, 4, 5, 6, 8 _____	108
Figure 40 – Comparison of mycelium size and shape of CCP and <i>ccpΔcas1</i> strains _____	109
Figure 41 – Virulence of mutant <i>ccpΔcas1</i> and wild-type CCP on detached leaves from 8 rubber clones _____	110
Figure 42 – Effect of spore concentration on CCP and <i>ccpΔcas1</i> virulence on detached rubber tree leaves _____	111
Figure 43 – Effect of leaf scraping on CCP and <i>ccpΔcas1</i> virulence on detached rubber tree leaves _____	112
Figure 44 – Virulence of CCP and <i>ccpΔcas1</i> on non-detached rubber tree leaves _____	113

Figure 45 – Toxicity of purified cassiicolin Cas1 on a susceptible clone, with or without previous abrasion of the leaves. _____	114
Figure 46 – Quantification of CCP and <i>ccpΔcas1</i> fungal mass by qPCR in leaves of IRCA631 rubber clone supplemented or not with the purified cassiicolin. _____	115
Figure 47 – Toxicity of 24 treatments (Tr) on 18 clones (Cl) expressed as percentage of induced electrolyte leakage _____	117
Figure 48 – Sensibilité contrastées des clones PB260 et RRIM600 à différents traitements impliquant la cassiicoline Cas1 (souche CCP ou cassiicoline purifiée) _____	129
Figure 49 – Principe du double hybride en levure _____	130
Figure 50 – Schéma simplifié de la construction de la banque ADNc dans la souche de levure Y187 selon le protocole Make Your Own "Mate and Plate" Library System (Clontech) _____	134
Figure 51 – Souches de levures diploïdes issues de la rencontre entre les souches haploïdes Y187 et Y2HGold _____	137
Figure 52 – Vérification de la présence des proies et appâts dans les souches de levure correspondantes _____	140
Figure 53 – Schéma récapitulatif du criblage de la banque ADNc codant les protéines proies interactrices de la cassiicoline _____	142
Figure 54 – ACP montrant le regroupement des échantillons des clones PB260 (haut) et RRIM600 (bas) en fonction des variables 'durée du traitement', 'répétitions' et 'traitement'. _____	153
Figure 55 – MA-plot montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés 12h et 24h après l'application de la cassiicoline Cas1 chez deux clones d'hévéa (PB260 et RRIM600) _____	154
Figure 56 – Expression différentielle des gènes des clones PB260 et RRIM600 en réponse à la toxine Cas1 purifiée _____	155
Figure 57 – Diagramme de Venn montrant les GDEs communs aux deux clones et spécifiques _____	157
Figure 58 – Classement des termes de GO les plus représentés parmi les GDEs communs aux clones PB260 et RRIM600 _____	159
Figure 59 – Classement des termes de GO les plus représentés parmi les GDEs trouvés seulement chez le clone sensible PB260 _____	162
Figure 60 – Classement des termes de GO les plus représentés parmi les GDEs trouvés seulement chez le clone sensible RRIM600 _____	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Les différentes familles de protéines PR, d’après van Loon <i>et al.</i> (2006)	11
Tableau 2 – Liste des HSTs connues à ce jour, extrait de Petrov <i>et al.</i> (2018)	17
Tableau 3 – Comportement de plusieurs clones d’hévéa face à la maladie CLF dans différents pays et continents, d’après Jayasinghe 2003	34
Tableau 4 – Effecteurs putatifs identifiés chez CCP, extrait de Lopez <i>et al.</i> (2018)	46
Tableau 5 – Résultats de l’analyse transcriptomique de l’interaction compatible entre CCP et le clone d’hévéa sensible PB260, extrait de Lopez <i>et al.</i> (2018)	47
Tableau 6 – Effecteurs putatifs "cœur" et "accessoires" identifiés parmi 36 isolats de <i>C. cassiicola</i> , extrait de Lopez <i>et al.</i> (2018)	48
Tableau 7 – Proportion des différents genres de champignons isolés à partir de feuilles malades d’hévéa, de manioc, de papaye et de pueraria, prélevées en Afrique de l’Ouest	67
Tableau 8 – Proportion des différents genres de champignons isolés à partir de feuilles saines d’hévéa, de manioc, de papaye et de pueraria, prélevées en Côte d’Ivoire en 2014 et 2016	70
Tableau 9 – <i>Corynespora cassiicola</i> isolates used in this study	100
Tableau 10 – In vitro comparison of mycelial growth, conidiation and germination rates between CCP and <i>ccpΔcas1</i>	109
Tableau 11 – QTL associated with sensitivity to <i>C. cassiicola</i> exudates, detected from the PB260 x RRIM600 F1 family	119
Tableau 12 – Génotypes des souches Y2HGold, Y187 et JM109	132
Tableau 13 – Efficacité de ‘mating’ entre les souches Y187 et Y2HGold transformées avec les plasmides recombinants correspondants	139
Tableau 14 – Résultats des tests d’auto-activation et de toxicité de la protéine appât	141
Tableau 15 – Protéines proies candidates issues du criblage de la banque d’ADNc des feuilles PB260 inoculées par CCP	143
Tableau 16 – Echantillons utilisés pour l’analyse transcriptomique (PB260 et RRIM600)	148
Tableau 17 – Taux de ‘mapping’ des échantillons PB260 et RRIM600	152
Tableau 18 – Gènes induits (vert) et réprimés (rouge) chez le clone PB260 en réponse à la cassiicoline, identifiés comme étant des ‘lrr receptor-like serine threonine-protein kinase’	165
Tableau 19 – Gènes induits (vert) et réprimés (rouge) chez le clone RRIM600 en réponse à la cassiicoline, identifiés comme étant des ‘lrr receptor-like serine threonine-protein kinase’	166
Tableau 20 – Gènes induits et réprimés en réponse à la cassiicoline chez le clone PB260, identifiés comme étant des ‘NBS-LRR resistance protein’	166
Tableau 21 – Interacteurs potentiels de la cassiicoline Cas1 identifiés par double hybride et retrouvés dans la liste des GDEs du clone PB260 traité avec la toxine purifiée Cas1	167
Tableau 22 – Interacteurs potentiels de la cassiicoline Cas1 identifiés par double hybride et retrouvés dans la liste des GDEs du clone RRIM600 traité avec la toxine purifiée Cas1	167

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 – Historique détaillé de la maladie CLF sur hévéa _____	202
Annexe 2 – Prélèvements foliaires pour isolements mycélien, effectués de 2012 à 2017 en Afrique de l’Ouest _____	206
Annexe 3 – Liste des amorces utilisées dans ce manuscrit _____	210
Annexe 4 – Liste des souches utilisées pour les analyses phylogénétiques _____	213
Annexe 5 – Data and statistical significance of Figures 41 to 44 (Chapitre 2) _____	219
Annexe 6 – Results of variance analysis of the %EL response of 18 clones to 24 treatments _____	222
Annexe 7 – Data and statistical significance of Figure 45 (Chapitre 2) _____	222
Annexe 8 – Composition et rôle des milieux de culture de levures _____	223
Annexe 9 – Carte du plasmide pGADT7-Rec _____	224
Annexe 10 – Carte du plasmide pGBKT7 _____	225

INTRODUCTION

Cette thèse portant sur le patho-système *Hevea brasiliensis/Corynespora cassiicola* a été menée au sein de l'UMR_547 PIAF (Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant), à l'Université Clermont Auvergne, en partenariat avec l'UMR AGAP (Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales). Elle s'intègre dans un projet financé par l'Institut Français du Caoutchouc (IFC), association regroupant la société Michelin (Clermont-Ferrand, France) et deux sociétés de plantations d'hévéas : la SIPH (Société Internationale de Plantations d'Hévéas, Courbevoie, France) et la SOCFIN (Société Financière des Caoutchoucs, Bruxelles, Belgique). Ces deux sociétés possèdent plusieurs plantations en Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire, Ghana, Libéria, Nigéria, Cameroun, Congo ou encore Sierra Leone), ainsi qu'en Asie pour la SOCFIN (Cambodge, Indonésie). L'IFC a été créée en 1934 dans le but de financer des programmes de recherches sur l'hévéa menés par des instituts comme le CIRAD, l'IRD, l'INRA ou des laboratoires de recherche universitaires, afin de répondre aux besoins des planteurs et de promouvoir le caoutchouc naturel.

Depuis 2008, l'IFC finance un projet pour lutter contre la maladie foliaire CLF (*Corynespora* Leaf Fall) causée par le champignon *Corynespora cassiicola*, devenue une préoccupation majeure pour les planteurs d'hévéa. Ce projet, appelé **IFC-Corynespora**, est porté par le Dr Valérie Pujade-Renaud de l'UMR AGAP (CIRAD). Il a pour objectif global de mettre au point des méthodes de diagnostic et de sélection pour une meilleure maîtrise du risque lié à la maladie CLF chez l'hévéa. Il s'est déroulé en plusieurs étapes. Le **projet IFC-Corynespora I** (2008-2011, thèse de Marine Déon) a permis d'acquérir de meilleures connaissances sur l'espèce *C. cassiicola*, à travers l'étude de sa diversité génétique et physiologique, de ses effecteurs (en particulier la cassiicoline), de ses différents modes de vie et de son pouvoir pathogène chez l'hévéa. Les **projets IFC-Corynespora II** (2011-2013, post-doc de Marine Déon) et **III** (2013-2016, thèse de Dinh Minh Tran) ont permis de mettre au point et de valider une méthode d'évaluation de la sensibilité des clones d'hévéa aux toxines sécrétés par *C. cassiicola* (test toxinique). Au moyen de ce test toxinique, des QTLs de sensibilité aux exsudats de *C. cassiicola* ont été identifiées par phénotypage d'une descendance issue du croisement entre un clone d'hévéa sensible et un clone tolérant à la CLF. Le **projet IFC-Corynespora IV** (2014-2016, CDD de David Lopez et de Sébastien Ribeiro) portait principalement sur une analyse *in silico* de la composition en effecteurs de différentes souches de *C. cassiicola*, dont une analyse transcriptomique lors d'une interaction compatible chez l'hévéa. Le **projet IFC-Corynespora V** (2016-2019) fait l'objet de cette thèse et sera détaillé dans la partie "Objectifs de thèse".

Ce mémoire s'organise en cinq grandes parties comportant une synthèse bibliographique, trois chapitres présentant mes travaux de recherche de thèse et une partie conclusion/perspectives.

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les interactions entre les plantes et les agents pathogènes fongiques

Les plantes sont régulièrement confrontées à une multitude d'**agents pathogènes** tels que des virus, des bactéries ou encore des champignons. Lorsque les mécanismes de défense mis en place par la plante sont suffisants pour lutter contre l'agresseur, elle est dite **résistante** et on parle d'**interaction incompatible**. En revanche, lors d'une **interaction compatible** le système immunitaire de la plante n'est pas capable de limiter la propagation du pathogène. La plante développe une maladie et est caractérisée de **sensible**. Il y a alors une diminution du potentiel de reproduction de l'hôte et, d'un point de vue agronomique, une réduction de la quantité et/ou de la qualité du produit végétal désiré. Dans cette synthèse bibliographique, seules les interactions plantes/champignons seront traitées.

1.1. Les modes de vie des champignons

Les champignons sont **hétérotrophes** vis-à-vis du carbone et dépendent de leur hôte pour l'acquisition des nutriments nécessaires à leur développement. Dans ce sens, ils ont développé différents types d'associations pouvant être réciproquement **bénéfiques**, **neutres** ou **délétères** pour le développement et la croissance de la plante.

Lorsqu'une association est bénéfique pour les deux partenaires, on parle de **mutualisme**. C'est le cas des champignons **mycorhiziens** vivant en symbiose avec les racines de 90% des espèces végétales du monde. Cette association permet à la plante d'augmenter sa capacité à puiser des ressources minérales, en exploitant un plus grand volume de sol (Mohammadi *et al.*, 2011). Elle permet également une meilleure tolérance à différents stress biotiques et abiotiques (Hashem *et al.*, 2018). En contrepartie, la plante fournit au champignon des composés carbonés directement assimilables et le protège des agressions extérieures (variations de température, prédateurs et pathogènes par exemple).

Il existe des champignons qui colonisent les tissus vivants de la plante sans causer de dommages apparents (Petrini, 1991; Hyde and Soyong, 2008). Il s'agit des **endophytes**, retrouvés aussi bien dans les parties aériennes que dans les parties souterraines des plantes hôtes. Certains semblent entretenir une relation mutualiste avec la plante. Ils ont la capacité de la protéger contre des maladies et de limiter les dommages causés par certains micro-organismes pathogènes (Gao *et al.*, 2010; Jalgaonwala *et al.*, 2011). D'autres tirent profit de l'interaction qu'ils entretiennent avec leur hôte qui reste non affecté. Cette interaction neutre pour la plante est qualifiée de **commensalisme**. Lorsque les feuilles entrent en sénescence, certains champignons endophytes peuvent changer leurs habitudes alimentaires et devenir **saprophytes** (Hyde *et al.*, 2007; Promputtha *et al.*, 2007). Ils se développent alors sur des débris végétaux en décomposition (bois et feuilles mortes) dont ils se nourrissent. Ils jouent un rôle important dans les écosystèmes en

transformant la matière organique en matière minérale, la rendant disponible pour d'autres organismes.

Enfin, les associations délétères concernent les champignons **pathogènes**, qui se développent au détriment de leur hôte, entraînant une perte de croissance ou l'abscission de certains organes, et parfois la mort. Ils causent des pertes importantes de rendement chez de nombreuses plantes d'intérêt agronomique (Dean *et al.*, 2012; Fisher *et al.*, 2012). Ils peuvent être classés en trois catégories selon leur mode trophique : nécrotrophe, biotrophe et hémi-biotrophe. Les agents pathogènes **nécrotrophes** émettent des molécules dont le but est de dégrader les cellules hôtes pour produire les nutriments nécessaires à leur développement. Les champignons pathogènes **biotrophes** contournent ou suppriment les réponses de défense de la cellule hôte, sans la détruire. Ils se développent dans les tissus vivants en détournant une partie des nutriments des cellules. Les agents pathogènes **hémi-biotrophes**, quant à eux, établissent d'abord une interaction de type biotrophe avec la plante hôte, puis deviennent nécrotrophes à des stades d'infection plus tardifs. La phase biotrophe peut durer plus ou moins longtemps selon le pathogène. De nombreuses espèces du genre *Colletotrichum*, par exemple, ont une étape biotrophique courte (2 à 3 jours ; Münch *et al.*, 2008) alors qu'elle peut s'étendre de 8 à 11 jours pour *Zymoseptoria tritici*, pathogène responsable de la septoriose du blé (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015; Kema *et al.*, 1996).

1.2. Infection des plantes par des champignons pathogènes

Le mécanisme d'**infection** des plantes par un champignon pathogène varie d'une espèce à l'autre mais comprend généralement un certain nombre d'étapes successives : adhésion, germination, pénétration et invasion (Javier Fernández-Acero *et al.*, 2007 ; Meng *et al.*, 2009). Chaque étape pouvant être stoppée à tout moment par la plante ou par des facteurs environnementaux.

L'infection démarre par l'**adhésion** de la spore fongique à la surface de la plante hôte, impliquant des processus chimiques et physiques (Tucker and Talbot, 2001). Pour cela, certaines spores sécrètent des molécules adhésives telles que des glycoprotéines insolubles dans l'eau (Sugui *et al.*, 1998), des lipides ou des polysaccharides (Nicholson, 1996), tandis que d'autres s'entourent d'une matrice extracellulaire (Howard, 1997). Après avoir adhéree et lorsque les conditions de croissance sont favorables, la spore entre en **germination**. Dans la plupart des cas, la mobilisation de sucres par le champignon est nécessaire et suffisante pour que la spore germe (Osheroov and May, 2001). D'autres fois, le déploiement du tube germinatif peut être induit par des substances ou des signaux d'origine végétale, tels que le contact avec une surface hydrophobe solide ou la présence de cires cuticulaires (Chaky *et al.*, 2001; Kolattukudy *et al.*, 1995).

Ces deux phases (adhésion et germination) sont communes à tous les champignons pathogènes. Cependant, les phases de **pénétration** et d'**invasion** de la plante diffèrent légèrement selon le

mode trophique du champignon. La spore germée pénètre à l'intérieur des tissus de l'hôte soit par des ouvertures naturelles (stomates), soit par des blessures, ou encore directement à travers la cuticule à l'aide de structures d'infection spécialisées appelées **appressoria** (Deising *et al.*, 2000; Ryder and Talbot, 2015). Afin de perforer la cuticule, l'appressorium des pathogènes biotrophes et héli-biotrophes s'attache fermement à la surface de l'hôte et applique une pression de turgescence importante, de l'ordre de 8 MPa (Howard *et al.*, 1991). Cette force mécanique associée à des enzymes de dégradation des parois permet au champignon de pénétrer les cellules de l'hôte, sans les détruire. Les champignons envahissent ensuite les cellules hôtes vivantes en développant des structures particulières appelées **haustoria**. Il s'agit d'hyphes issus de l'appressorium, entourés par la membrane plasmique végétale qui s'est invaginée mais qui ne se déchire pas (Perfect and Green, 2001; Meng *et al.*, 2009 ; **Figure 1**). Ces structures sont impliquées dans l'absorption des nutriments et dans la sécrétion de diverses molécules.

Certains champignons nécrotrophes tels que *Botrytis cinerea* déploient également des appressoria mais ne pénètrent pas la cuticule de manière mécanique. La pénétration et l'invasion ont lieu grâce à l'action d'enzymes de dégradation de la paroi et de toxines sécrétées au point de contact, dont le but est de détruire les cellules de l'hôte (Laluk and Mengiste, 2010). En revanche, ils ne développent pas de structures de type haustorium à l'intérieur de l'hôte.

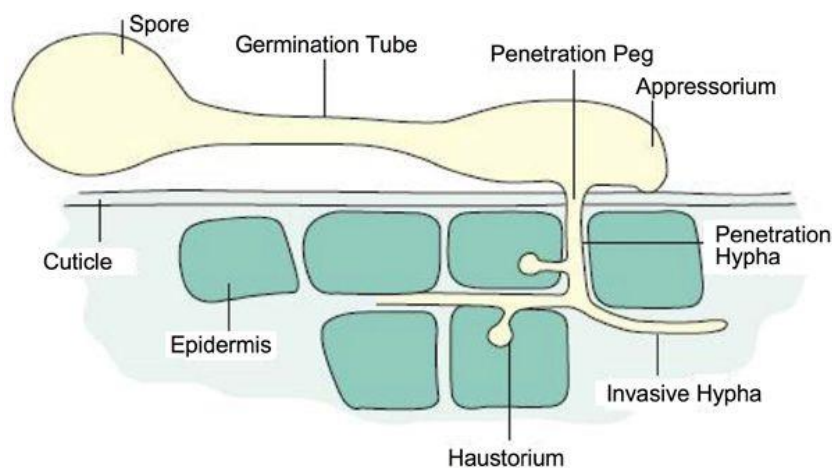


Figure 1 – Processus infectieux classique des champignons biotrophes et héli-biotrophes

Une spore adhère à la surface d'une feuille et émet un tube germinatif qui s'allonge. Ce dernier détecte la topographie de la cuticule et développe un appressorium afin de rentrer dans les tissus de la plante. L'hyphe issue de l'appressorium provoque une invagination des cellules de l'hôte pour former un haustorium. À ce stade, le pathogène commence à absorber des quantités massives de nutriments, établissant ainsi la biotrophie. Extrait de Meng *et al.* (2009).

1.3. L'immunité des plantes face aux pathogènes fongiques

La première ligne de défense des plantes face aux agents pathogènes fongiques consiste à empêcher la pénétration du champignon dans les cellules de l'hôte, à l'aide de barrières physiques (paroi cellulaire, cuticule, cires) et/ou chimiques (molécules anti-fongiques) pré-existantes (Heath, 2000; Thordal-Christensen, 2003). C'est ce qu'on appelle les **défenses préformées** ou **constitutives**. Cette protection, mise en place avant que la plante ne soit en contact avec un agent pathogène, ne sont parfois pas suffisantes. Les champignons qui réussissent à franchir les défenses préformées de la plante doivent alors faire face à des mécanismes plus sophistiqués de reconnaissance des agents pathogènes et d'induction de mécanismes de défenses. On distingue deux niveaux d'**immunité induite**, qui seront détaillés dans les paragraphes suivants : la **PTI** (**Pattern-Triggered Immunity**) et l'**ETI** (**Effector-Triggered Immunity**). Le modèle le plus couramment utilisé pour illustrer les interactions entre la plante et les agents pathogènes est appelé **modèle en zigzag** (Jones & Dangl, 2006 ; **Figure 2**). Toutes les composantes de ce modèle, décrit initialement pour les champignons biotrophes, seront traitées dans les parties suivantes.

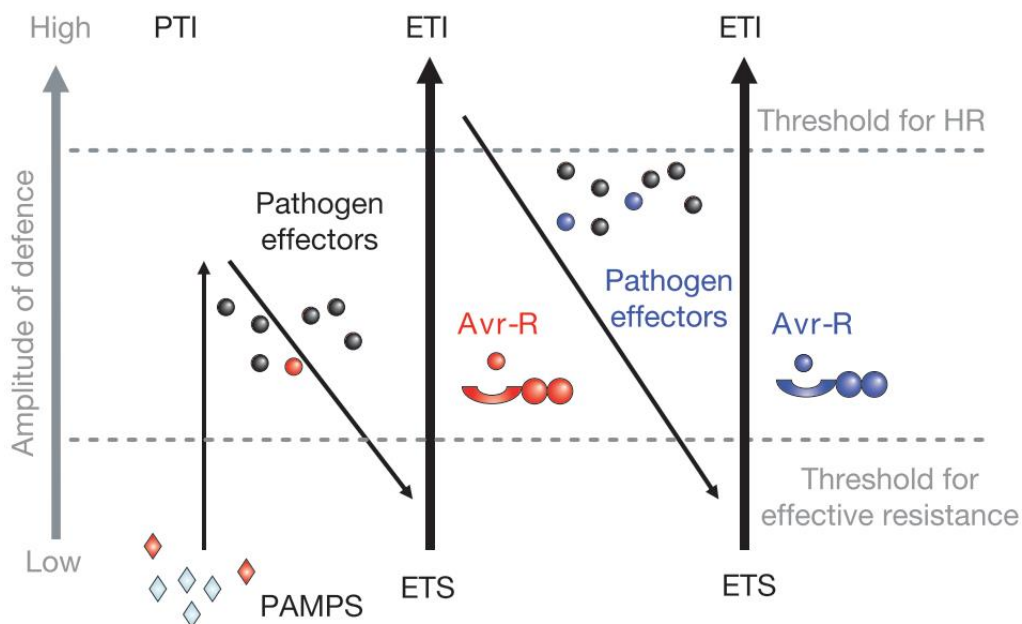


Figure 2 – Le modèle en zigzag illustrant le système immunitaire des plantes en réponse aux agents pathogènes biotrophes

En phase 1, les plantes détectent des MAMPs/PAMPs (Microbial/Pathogen-Associated Molecular Patterns, losanges) *via* des PRRs (Pattern Recognition Receptor) et déclenchent la PTI (Pattern-Triggered Immunity). En phase 2, certaines souches pathogènes délivrent des effecteurs qui peuvent interférer avec la PTI, entraînant l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility). En phase 3, un effecteur (rond rouge) est reconnu par un récepteur de la plante ce qui active l'ETI (Effector-Triggered Immunity), une version amplifiée de la PTI allant jusqu'à l'induction d'une mort cellulaire localisée chez l'hôte. Cette réaction d'hypersensibilité (HR) suffit à bloquer la propagation du pathogène dans le cas des champignons biotrophes. En phase 4, sont sélectionnés des isolats ayant perdu l'effecteur rouge, ou ayant gagné de nouveaux effecteurs par transfert de gène horizontal (en bleu), entraînant la suppression de l'ETI. La sélection de plantes capables de reconnaître cet effecteur nouvellement acquis permet à nouveau l'ETI. D'après Jones & Dangl, 2006.

1.3.1. L'activation de la PTI par les PAMPs, MAMPs ou DAMPs

La PTI est la première réponse de l'hôte induite suite à la perception d'un agent pathogène. Elle est déclenchée par la reconnaissance de motifs moléculaires communs à de nombreux micro-organismes : les **PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns)**. Plus généralement, on parle aussi de **MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns)**, pour inclure les signaux provenant de micro-organismes non pathogènes (Ausubel, 2005). Ces motifs comprennent des constituants de la surface cellulaire et pariétale des champignons (β -glucanes, ergostérols ou chitine) et des enzymes sécrétées (xylanase par exemple). Lors d'une blessure ou suite à la pénétration du pathogène dans les cellules hôtes, des molécules émises par la plante peuvent également déclencher la mise en place des défenses basales : il s'agit des **DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns ; Lotze *et al.*, 2007)**. Certains auteurs parlent alors de DTI (DAMP-Triggered Immunity). Ici, nous parlerons de PTI (Pattern-Triggered Immunity) au sens large pour désigner les réponses de la plante activées par les PAMPs, MAMPs et DAMPs.

Les PAMPs (ou MAMPs/DAMPs) sont reconnus par des récepteurs membranaires de la cellule hôte de la plante, appelés **PRRs (Pattern Recognition Receptor)**, appartenant à la classe des **RLP (Receptor-Like Proteins)** ou des **RLK (Receptor-Like Kinases)** (Zipfel, 2014; Jones and Dangl, 2006). Ces deux types de récepteurs ont tous deux un domaine extracellulaire de liaison aux PAMPs, un domaine transmembranaire et, dans le cas des RLK seulement, un domaine kinase intracellulaire transducteur de signal (Monaghan and Zipfel, 2012). Le domaine extracellulaire peut être de type **LRR (Leucine-Rich Repeat)** ou **LysM (Lysin Motif)**. On parlera alors de récepteurs de type LRR-RLP, LRR-RLK, LysM-LRR ou LysM-RLK.

La molécule PAMP la plus étudiée chez les champignons est la **chitine (Figure 3)**, constituant majeur de la paroi fongique (Shibuya and Minami, 2001). La reconnaissance de la chitine par le récepteur de type LysM-RLK CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1) d'*Arabidopsis thaliana* est nécessaire pour l'activation de la transduction du signal immunitaire (Miya *et al.*, 2007; de Jonge *et al.*, 2010). Chez le riz, un récepteur de type PRR contenant un domaine LysM appelé CEBiP (Chitin Elicitor-Binding Protein) est nécessaire pour la perception et la signalisation de la chitine, en plus de CERK1 (Kaku *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2010). Chez la tomate, les récepteurs Eix1 et Eix2 de type LRR-RLPs reconnaissent des **xylanases** fongiques présentes chez de nombreux pathogènes (Ron and Avni, 2004) alors que la reconnaissance de la molécule PAMP **Ave1** par le récepteur Ve1 (LRR-RLPs) induit une résistance vis-à-vis des champignons du genre *Verticillium* et de l'espèce *Fusarium oxysporum* (de Jonge *et al.*, 2012).

La détection des DAMPs a été bien décrite chez *A. thaliana* (Figure 3). Les récepteurs PEPR1 et PEPR2 de type LRR-RLKs perçoivent des **AtPeps**, une famille de peptides DAMPs qui sont des

éliciteurs endogènes du système immunitaire des plantes activés par divers pathogènes (Krol *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010). Les champignons produisent des enzymes qui dégradent les parois cellulaires au cours de l'infection et ce processus libère des molécules actives normalement incorporées dans la matrice de la paroi cellulaire végétale. De telles molécules, appelées **oligogalacturonides** (OGs), peuvent être perçues par les récepteurs RLK-WAK1 d'*A. thaliana* contenant un domaine EGF-like (Epidermal Growth Factor) (Brutus *et al.*, 2010).

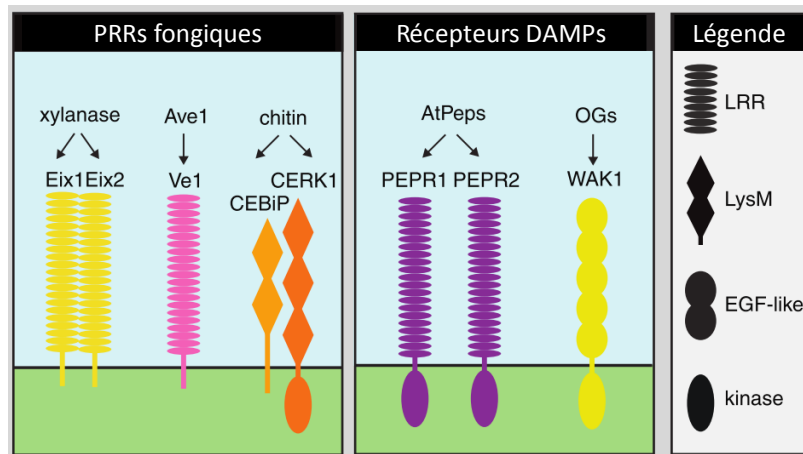


Figure 3 – Exemples de couples PAMPs/PRRs

Eix, Ethylene-inducing xylanase ; CERK1, Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 ; CEBiP, Chitin Elicitor–Binding Protein ; PEP, Plant Elicitor Peptides ; PEPR, PEP receptor ; OG, oligogalacturonides ; LRR, Leucin-Rich Repeat ; LysM, Lysin Motif ; EGF, Epidermal Growth Factor.

Extrait de Monaghan & Zipfel (2012).

La PTI constitue un premier niveau de défense **peu spécifique** mais permet dans la plupart des cas de limiter la propagation des micro-organismes pathogènes dans la plante. En effet, la reconnaissance des PAMPs/DAMPs par les récepteurs PRRs active différentes voies de signalisation, comprenant la dépolarisation de la membrane plasmique, l'ouverture de canaux ioniques, l'activation de cascades de phosphorylation impliquant des MAPKs (Mitogen-Associated Proteins Kinases), l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène ou encore la synthèse de phyto-hormones telles que l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique (Bigeard *et al.*, 2015). Ce qui a pour conséquence l'activation d'un certain nombre de gènes de défense de la plante. Parmi ces gènes, on peut citer ceux codant les **protéines PR (Pathogenesis-Related)** classées en 17 familles d'après leurs similitudes de séquences en acides aminés et leurs propriétés enzymatiques (van Loon *et al.*, 2006; Sels *et al.*, 2008 ; **Tableau 1**). Ces protéines sont nommées ainsi car elles sont faiblement détectables dans les tissus végétaux sains alors qu'elles s'accumulent fortement lors d'une blessure ou lors d'une attaque par un pathogène. On les retrouve dans de nombreuses plantes (riz, blé, maïs, sorgho, orge, tomate, haricot, soja, poivre, tournesol, carotte, vigne, hévéa...) même si la classification du Tableau 1 n'en montre qu'une

seule, correspondant aux espèces où les protéines PR ont été le plus étudiées. Certaines de ces familles comprennent des protéines à activité anti-fongique telles que des chitinases (PR-3, 4, 8 et 11) et des β -1,3-glucanases (PR-2), capables de dégrader les parois fongiques. D'autres familles contiennent des inhibiteurs de protéases (PR-6) pouvant bloquer la synthèse de la chitine pariétale fongique et donc la croissance, des peroxydases (PR-9) qui interviennent dans l'insolubilisation des protéines et des composés phénoliques permettant ainsi le renforcement de la paroi ou encore des défensines (PR-12) permettant d'inhiber la croissance de plusieurs pathogènes.

Tableau 1 – Les différentes familles de protéines PR, d'après van Loon *et al.* (2006)

Famille	Plante	Exemple type	Propriété
PR-1	Tabac	PR-1a	Antifongique
PR-2	Tabac	PR-1	β 1,3-glucanase
PR-3	Tabac	P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VI
PR-4	Tabac	R	Chitinase type I, II
PR-5	Tabac	S	Thaumatococin-like
PR-6	Tomate	Inhibitor I	Inhibiteur de protéase
PR-7	Tomate	P ₆₉	Endoprotéinase
PR-8	Concombre	Chitinase	Chitinase de type III
PR-9	Tabac	lignin-forming peroxidase	Péroxydase
PR-10	Persil	PR1	Ribonucléase-like
PR-11	Tabac	Class V chitinase	Chitinase de type I
PR-12	Radis	Rs-AFP3	Défensine
PR-13	<i>A. thaliana</i>	THI2.1	Thionine
PR-14	Orge	LTP4	Protéine de transfert de lipides
PR-15	Orge	OxOa	Oxalate oxydase
PR-16	Orge	OxOLP	Oxalate oxydase like
PR-17	Tabac	PRp27	Inconnue

D'autres gènes de défense codent des protéines impliquées dans des voies de biosynthèse de métabolites secondaire telles que les **phytoalexines** (Ahuja *et al.*, 2012). Ce sont des molécules de faible poids moléculaire et dont la nature chimique est variée, présentant souvent une activité anti-microbienne. Plus de 350 phytoalexines appartenant à au moins 30 familles de plantes ont été identifiées, dont des terpènes comme l'avénacine A-1 de l'avoine, des alcaloïdes (camalexine d'*A. thaliana* et tomatine de la tomate) ou des phénols telle que pisatine du pois (Bednarek, 2012). L'hévée produit une phytoalexine, la scopolétine, qui inhibe la germination des conidies de différents pathogènes foliaires tels que *Colletotrichum gloeosporioides*, *Microcyclus ulei* et *Corynespora cassiicola* (Breton *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 1995; Giesemann *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2001). Enfin, un autre moyen de défense de la plante est la sécrétion de **callose** (polymère de β -1,3-glucane), qui permet de renforcer la paroi végétale au niveau du site d'infection et donc de limiter la progression de l'agent pathogène (Luna *et al.*, 2011).

1.3.2. Immunité et sensibilité déclenchées par les effecteurs

Un second niveau d'immunité très spécifique est mis en place par la plante hôte, basé sur la reconnaissance ou la non-reconnaissance des **effecteurs** fongiques. Ces derniers sont définis comme des molécules sécrétées par un organisme et ayant un impact sur le devenir de l'interaction avec son hôte. Ils sont sécrétés par certains pathogènes dans le but de manipuler ou de contourner la PTI, ce qui lui permet de s'installer et de se développer dans les tissus de la plante hôte, entraînant l'apparition des symptômes de la maladie (Presti *et al.*, 2015). On parle alors d'**ETS (Effector-Triggered Susceptibility)** dans le cas des champignons biotrophes (**Figure 2**) et de **NETS (Necrotrophic Effector-Triggered Susceptibility)** dans le cas des champignons nécrotrophes.

L'immunité spécifique des plantes diffère selon le mode trophique des champignons. Elle a été mise en évidence pour la première fois dans le cas de l'interaction entre le lin et le champignon biotrophe *Melampsora lini* (Flor, 1955). Dans ce patho-système, une **protéine de résistance** de la plante hôte (**R**) reconnaît spécifiquement un effecteur sécrété par l'agent pathogène, appelé **facteur d'avirulence (Avr)**. Suite à cette interaction, la plante déclenche un second niveau de défense, rapide et violent, se traduisant en particulier par la mort des cellules voisines du point d'infection. Cette **réaction hypersensible** ou **HR (Hypersensitive Response)** localisée a pour effet de stopper la propagation du pathogène. On parle de réaction incompatible. En l'absence (ou en cas de variation allélique) d'un seul des deux interacteurs (Avr ou R), le pathogène peut poursuivre son développement ; la réaction est compatible. Cette forme d'immunité, qui repose sur le concept d'interaction **gène-pour-gène** (Flor, 1955 ; **Figure 4-A**) est appelée ETI (Jones & Dangl, 2006 ; **Figure 2**). Cependant, la HR caractérisée par la mort cellulaire programmée est favorable aux champignons nécrotrophes (Lorang *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2012). Un modèle d'interaction **gène-pour-gène inverse** a donc été proposé dans le cas des nécrotrophes (**Figure 4-B**). Dans ce modèle, la maladie se déclare seulement si un effecteur de nécrotrophie (ou toxine) interagit avec le produit d'un gène de l'hôte appelé **facteur de sensibilité**. L'absence (ou la variation allélique) de l'effecteur ou du facteur de sensibilité conduit à la résistance.

Les réponses de défense des plantes induites par l'ETI ou par la PTI sont qualitativement similaires (pic oxydatif, changements hormonaux, reprogrammation transcriptionnelle) mais des différences quantitatives sont observées (Cui *et al.*, 2015). Ce qui les différencie c'est leur intensité et leur cinétique : elles sont plus soutenues et prolongées dans le cas de l'ETI alors qu'elles sont moins intenses et transitoires dans le cas de la PTI (Tsuda & Katagiri, 2010 ; **Figure 5**).

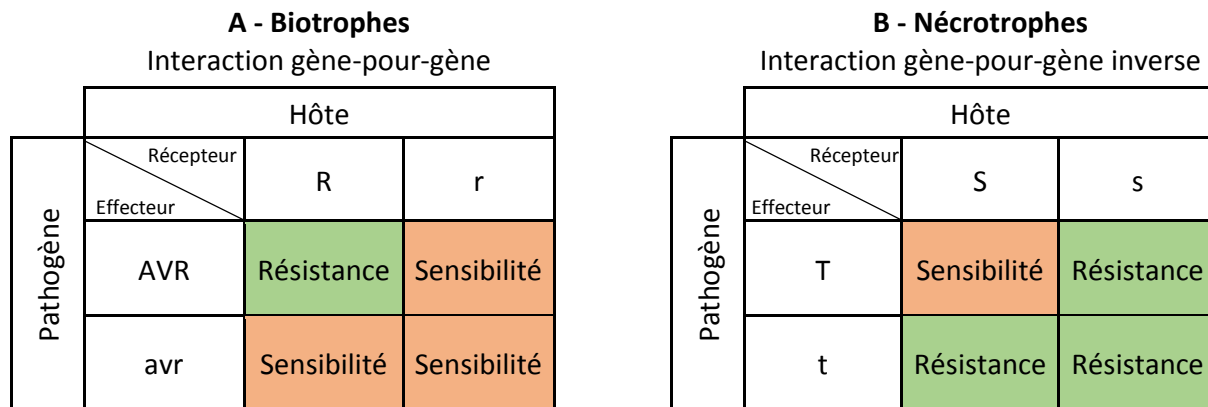


Figure 4 – Comparaison des interactions "gène-pour-gène" dans les patho-systèmes biotrophes (A) et nécrotrophes (B)

A. Dans le cas d'une interaction incompatible, le produit d'un gène de résistance R porté par la plante interagit avec le produit d'un gène d'avirulence AVR porté par le pathogène (effecteur). Ceci induit une réaction d'hypersensibilité impliquant la mort des cellules de l'hôte au point d'infection, empêchant ainsi la propagation du pathogène. Lorsqu'au moins un des deux interacteurs est absent ou qu'il se présente sous une autre forme allélique (r ou avr), la réaction est dite compatible et la plante est alors sensible au pathogène.

B. Dans le cas d'une interaction compatible, le produit d'un gène de sensibilité S de l'hôte interagit avec le produit d'un gène codant un effecteur de type toxine (T) porté par le pathogène. Ceci induit chez la plante une réaction (mort cellulaire) favorable à la propagation du champignon. Lorsqu'au moins un des deux interacteurs est absent ou qu'il se présente sous une autre forme allélique (s ou t), l'interaction est dite incompatible et la plante reste résistante au pathogène.

Adapté de Stukenbrock & McDonald (2009).

1.3.2.1. Effecteurs biotrophes et gènes de résistance

L'arsenal en effecteurs des champignons biotrophes est celui qui a été le plus largement étudié (**Figure 6**). Ils sont sécrétés précocement de manière à perturber les défenses de la plante (PTI) et ainsi permettre la pénétration et la colonisation, tout en gardant les cellules de l'hôte vivante. Les effecteurs protéiques **Pep1**, **Pit2** et **Cmu1** sont sécrétés par le pathogène *Ustilago maydis* lors d'une interaction avec le maïs. Pep1 inhibe l'activité de la peroxydase POX12, impliquée dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Hemetsberger *et al.*, 2012) alors que Pit2 et Cmu1 interfèrent avec la voie de signalisation de l'acide salicylique (Djamei *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2013). Certains effecteurs peuvent inhiber les défenses de la plante en interagissant avec les protéines PR induites lors de la PTI. C'est le cas de la protéine **CSEP0055** de *Blumeria graminis* qui interagit avec les protéines PR1 et PR17 de l'orge (Zhang *et al.*, 2012). Dans le patho-système tomate/*Cladosporium fulvum*, pour presque tous les effecteurs protéiques identifiés (**Avr2**, **Avr4**, Avr5, Avr9, Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5 et **Ecp6**), il existe un gène de résistance de type RLP associé (de Wit *et al.*, 2016). Les effecteurs Avr4 et Ecp6 sont des protéines qui se lient à la chitine, protégeant le champignon contre l'effet délétère des chitinases végétales (Stergiopoulos *et al.*, 2010; de Jonge *et al.*, 2010), alors que Avr2 inhibe l'activité cystéine protéase de la protéine Rcr3 de la tomate (Shao *et al.*, 2003).

Les effecteurs qui sont reconnus par la plante et qui déclenchent l'ETI sont appelés facteurs d'avirulence. Une interaction incompatible entre le champignon et la plante hôte résulte d'une reconnaissance spécifique entre un facteur d'avirulence du champignon et une protéine R spécifique de la plante (**Figure 4**). La majorité des protéines R chez les plantes sont des protéines de type **NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site – Leucine-Rich Repeat)**. Cette grande famille est codée par des centaines de gènes et peut être divisée en deux sous-familles, différenciée par la présence d'un domaine **TIR (Toll-Interleukin-1 Receptor)** ou d'un domaine **CC (Coiled Coil)** à leur extrémité N-terminale (McHale *et al.*, 2006).

Les facteurs d'avirulence peuvent être reconnus par des protéines NBS-LRR de manière directe ou indirecte (**Figure 7**). Certaines **interactions directes (Figure 7-A)** ont été démontrées par des techniques d'interaction protéine-protéine telle que la technique de "double hybride en levures". C'est le cas par exemple de la protéine cytosolique Pi-ta de type CC-NBS-LRR du riz qui se lie physiquement à l'effecteur AvrPita de *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.*, 2000). Les protéines L et M de type TIR-NBS-LRR du lin interagissent également directement avec les effecteurs AvrL567 et AvrM de *Melampsora lini*, respectivement (Dodds *et al.*, 2006).

Les **interactions indirectes** sont plus complexes et impliquent un troisième partenaire protéique (van der Hoorn and Kamoun, 2008). On distingue le modèle de garde et le modèle du leurre. Dans ces deux modèles, une protéine cible de l'hôte subit une modification due à l'activité enzymatique d'un effecteur. Une protéine R de la plante reconnaît alors la protéine cible modifiée plutôt que l'effecteur lui-même et déclenche l'ETI.

Dans le **modèle de garde (Figure 7-B et C)**, la protéine cible modifiée est dite "gardée". Lors d'une interaction compatible (absence de protéine R), cette cible est indispensable pour la fonction de virulence de l'effecteur et pour l'établissement de la maladie, au même titre que d'autres protéines, cibles potentielles de l'hôte (modèle de garde multiple). Lors d'une interaction incompatible, seule la cible "gardée" est reconnue par une protéine R déclenchant les mécanismes de résistances de l'hôte. Le modèle de garde explique comment plusieurs effecteurs peuvent être perçus par une seule protéine R, permettant ainsi à un répertoire de gènes R relativement petit de cibler la grande diversité de pathogènes attaquant les plantes (Dangl and Jones, 2001). L'exemple le plus connu est celui de la protéine de garde membranaire RIN4 d'*A. thaliana* interagissant avec les effecteurs AvrRpm1, AvrPt2, AvrB, AvrPto et HopF2 de *Pseudomonas syringae* (Mackey *et al.*, 2003). La phosphorylation de RIN4 par AvrRpm1 et AvrB entraîne l'activation de la protéine végétale de type NBS-LRR RPM1, conférant la résistance au champignon. De la même façon, le clivage de RIN4 par AvrPt2 active RPS2, une autre protéine de résistance d'*A. thaliana* de type NBS-LRR.

Dans le **modèle du leurre** (Figure 7-D), la protéine cible modifiée (appelée leurre) mime une protéine effectrice de l'hôte et entre en compétition avec cette dernière pour la reconnaissance de l'effecteur. En l'absence de protéine R, l'interaction entre la protéine leurre et l'effecteur fongique ne déclenchera pas la maladie. L'effecteur protéique Avr2 de *C. fulvum* inhibe l'activité des cystéines protéase RCR3 et PIP1 induites au cours de l'infection de la tomate (Shabab *et al.*, 2008). Ces deux protéines jouent des rôles différents lors de l'infection. En effet, PIP1 s'accumule plus fortement que RCR3 et intervient dans la mise en place de la virulence du champignon. De plus, des mutants *rcr3* présentent des profils de sensibilité à *C. fulvum* similaires à des plantes sauvages dépourvues du gène de résistance Cf-2 de la tomate, impliquée dans la reconnaissance de Avr2 et donc dans le déclenchement de l'ETI. Ceci suggère que la cible d'Avr2 est PIP1 et que la protéine RCR3 ne contribue pas à la virulence du champignon mais joue le rôle de leurre dans cette interaction.

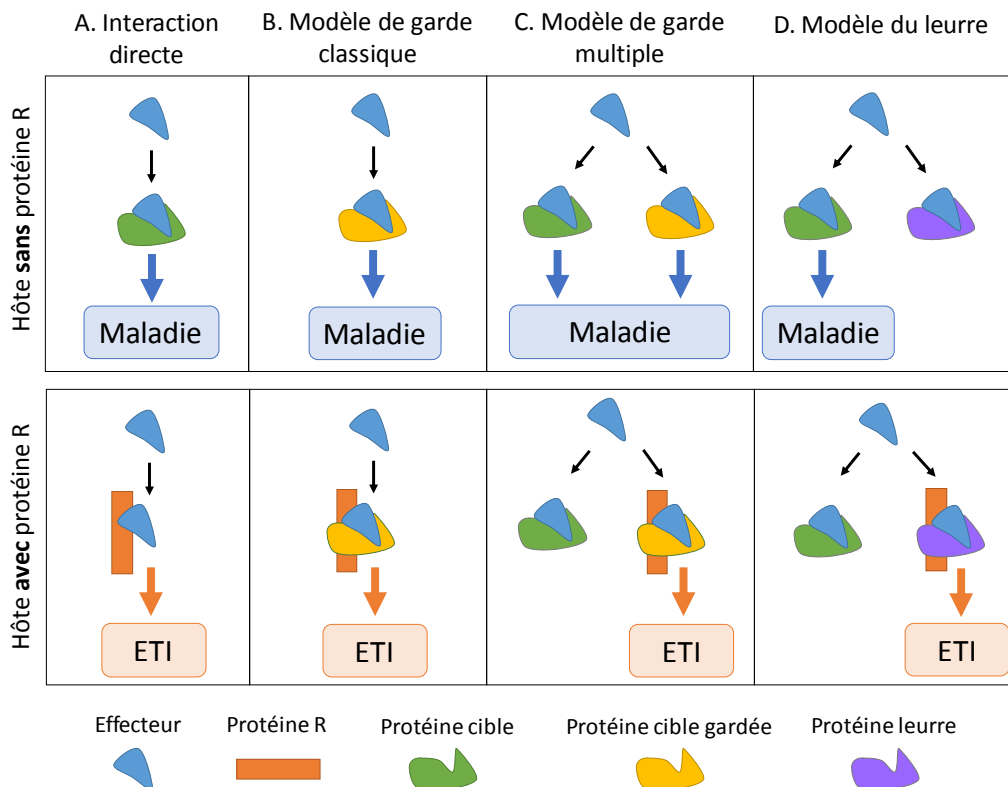


Figure 7 – Différents modèles d'interaction entre protéines de résistances et effecteurs

A, Interaction directe. En absence de protéine R (orange), l'effecteur (bleu) se lie à sa protéine cible opérationnelle (vert) et entraîne la maladie. La protéine R reconnaît directement l'effecteur, ce qui active l'ETI.

B et C, Modèles de garde. En absence de protéine R (orange), l'effecteur se lie avec sa ou ses cible(s) opérationnelle(s) (vert et jaune), entraînant la maladie. En présence de protéine R, la cible modifiée par l'effecteur (dite gardée en jaune) est reconnue par la protéine R, ce qui déclenche l'ETI.

C, Modèle du leurre. En absence de protéine R (orange), l'effecteur se lie soit à sa cible opérationnelle (vert) et déclenche la maladie, soit à une protéine leurre (violet), ce qui n'a aucun effet direct (la protéine leurre n'est pas une cible opérationnelle). Cependant, en présence de protéine R, la protéine leurre modifiée par l'effecteur est reconnue par la protéine R, ce qui déclenche l'ETI.

Adapté d'après van der Hoorn & Kamoun (2008).

1.3.2.2. Effecteurs nécrotrophes et gènes de sensibilité

Les effecteurs nécrotrophes sont sécrétés dans le but de détruire les cellules hôtes soit directement, soit en déclenchant une mort cellulaire programmée. De manière générale, on parlera de toxines. Celles-ci peuvent être de nature variable : métabolites secondaires, protéines ou petits ARN (Duke & Dayan, 2011; Friesen *et al.*, 2008). On distinguera les **toxines hôte -spécifiques** ou **-sélectives** et les **toxines non hôte-spécifiques**. Dans le premier cas, elles peuvent reconnaître une cible spécifique chez une seule plante hôte (Host-Specific Toxin) ou sur une gamme de plantes hôtes restreintes (Host-Selective Toxin). On parlera de **HSTs** au sens large pour ces deux types de toxines. La plupart des HST sont nécessaires aux champignons qui les produisent pour envahir les tissus et induire la maladie (Friesen *et al.*, 2008; Walton, 1996; Wolpert *et al.*, 2002). Jusqu'à présent, une vingtaine de ces toxines ont été identifiées, dont la nature, le nom du pathogène qui la produit et le nom de la plante hôte, sont résumés dans le **Tableau 2** (Petrov *et al.*, 2018).

Tableau 2 – Liste des HSTs connues à ce jour, extrait de Petrov *et al.* (2018)

Nom de la toxine	Nature de la toxine	Pathogène	Plante hôte
AK-toxin	Métabolite secondaire	<i>Alternaria alternata</i>	Poire japonaise
AM-toxin	Métabolite secondaire	<i>Alternaria alternata</i>	Pomme
AF-toxin	Métabolite secondaire	<i>Alternaria alternata</i>	Fraise
ACT-toxin	Métabolite secondaire	<i>Alternaria alternata</i>	Mandarine
ACR-toxin	Métabolite secondaire	<i>Alternaria alternata</i>	Citron
AAL-toxin	Métabolite secondaire	<i>Alternaria alternata</i>	Tomate
Brassicocolin A	Métabolite secondaire	<i>Alternaria brassicicola</i>	Brassicacées
HC-toxin	Métabolite secondaire	<i>Cochliobolus carbonum</i>	Maïs
T-toxin	Métabolite secondaire	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	Maïs
ChToxA	Protéine	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	Maïs
Victorin	Métabolite secondaire	<i>Cochliobolus victoriae</i>	Avoine
HS-toxin	Métabolite secondaire	<i>Bipolaris sacchari</i>	Canne à sucre
PM-toxin	Métabolite secondaire	<i>Pyronellaea zae-maydis</i>	Maïs
PC-toxins	Métabolite secondaire	<i>Periconia circinata</i>	Sorgho
Ptr ToxA	Protéine	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Maïs
Ptr ToxB	Protéine	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Maïs
Ptr ToxC	Métabolite secondaire	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Maïs
SnToxA	Protéine	<i>Stagonospora nodorum</i>	Maïs
SnTox1 à 7	Protéine	<i>Stagonospora nodorum</i>	Maïs
SV-toxins	Métabolite secondaire	<i>Stemphylium vesicarium</i>	Poires européennes
Phomalide	Métabolite secondaire	<i>Leptosphaeria maculans</i>	Canola, colza
Depsilairdin	Métabolite secondaire	<i>Leptosphaeria maculans</i>	Moutarde brune
Maculansins	Métabolite secondaire	<i>Leptosphaeria maculans</i>	Moutarde brune

Parmi ces HSTs, la **T-toxine** (**Figure 6**) est un métabolite secondaire produit par *Cochliobolus heterostrophus* de la race T, très agressive sur les lignées de maïs "Texas" présentant une stérilité mâle TMS (Texas Male Sterile ; Hack *et al.*, 1991). La sensibilité de ces lignées TMS est liée à la présence de la protéine mitochondriale URF-13 qui interagit avec la T-toxine, ayant pour conséquence la formation de pores dans les membranes des mitochondries entraînant des fuites

d'électrolytes et la mort de la cellule. Le champignon nécrotrophe *Alternaria alternata* produit six HSTs de type métabolite secondaire (Takaoka *et al.*, 2014), chacune spécifique d'une seule plante hôte. L'AAL-toxine par exemple, inhibe la sphingosine-N-acétyltransférase de la tomate, enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des sphingolipides et jouant un rôle important au niveau de l'intégrité des membranes (Gilchrist *et al.*, 1995). Les sites d'action des autres HSTs se situent dans la membrane plasmique (toxines A, AF et ACT de la poire japonaise, de la fraise et de la mandarine, respectivement ; Park & Ikeda, 2008) et dans les chloroplastes (toxine AM de la pomme ; Park & Ikeda, 2008) ou dans les mitochondries (toxine ACR du citron ; Kohmoto *et al.*, 1984). Les toxines non hôte-spécifiques possèdent une gamme d'hôtes plus large que les toxines hôte-sélectives et sont des déterminants secondaires du pouvoir pathogène (Walton, 1996). La plupart sont des métabolites secondaires, dont une liste exhaustive a été décrite par Stergiopoulos *et al.* (2013). Certains sont de **petits ARNs** agissant en tant qu'effecteurs fongiques. Dans le patho-système *Botrytis cinerea/A. thaliana* par exemple, des petits ARNs produits par le champignon sont administrés dans les cellules hôtes et détournent sa machinerie d'ARNi (ARN interférent) en se liant à la protéine AGO1 (Arabidopsis Argonaute 1 ; **Figure 6**), ce qui a pour conséquence de désactiver sélectivement les gènes d'immunité de la plante (Weiberg *et al.*, 2013).

Comme expliqué précédemment, les allèles ciblés par les HSTs dans le génome des plantes confèrent une sensibilité plutôt qu'une résistance aux champignons nécrotrophes (Stergiopoulos *et al.*, 2013). Chez le blé par exemple, le champignon nécrotrophe *Stagonospora nodorum* secrète cinq HSTs (SnToxA, SnTox1, SnTox2, SnTox3 et SnTox4) capables d'interagir directement ou indirectement avec les produits de leurs **gènes de sensibilité** respectifs (Tsn1, Snn1, Snn2, Snn3 et Snn4), ce qui induit la maladie (Friesen *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2011). Le but de toutes ces HSTs est d'induire la mort cellulaire de l'hôte, permettant le développement du champignon qui les produit. Le gène *Tsn1* confère également la sensibilité à l'HST protéique PtrToxA sécrétée par *Pyrenophora tritici-repentis*, agent responsable de l'helminthosporiose du blé (Ciuffetti *et al.*, 2010 and 2014). Il a été démontré que cette protéine est internalisée dans les cellules hôtes lors de l'infection de génotypes de blé sensibles et localisée au niveau des chloroplastes, entraînant une perturbation de la photosynthèse et la mort des cellules hôtes. Le mode d'action de la HC-toxine sécrétée par *Cochliobolus carbonum* est un contre-exemple d'induction de la sensibilité par les HSTs. En effet, cette toxine inhibe les histones déacétylases du maïs et affaiblit ainsi les défenses de la plante (Walton, 2006). Dans ce cas, la sensibilité de l'hôte est conférée par l'absence du gène *Hm1*, qui code pour une réductase qui détoxifie la HC-toxine. Elle apparaît donc différente des autres HST dans le sens où elle supprime plutôt qu'elle ne déclenche les réponses de défense de l'hôte et que la sensibilité est conférée par le manque plutôt que par la présence d'un gène de l'hôte.

2. Le patho-système *Hevea brasiliensis*/*Corynespora cassiicola*

2.1. *Hevea brasiliensis*

2.1.1. Description botanique

L'hévéa est un arbre de la famille des **Euphorbiacées** dont on extrait le **latex** qui contient des particules de **caoutchouc naturel** (Compagnon, 1986; Mooibroek and Cornish, 2000). Le genre *Hevea* regroupe dix espèces : *H. benthamiana*, *H. brasiliensis*, *H. camporum*, *H. guianensis*, *H. microphylla*, *H. nitida*, *H. pauciflora*, *H. rigidifolia*, *H. spruceana* et *H. camargoana*. Toutes produisent du latex en quantité variable mais pour la plupart, ce latex est très résineux et de mauvaise qualité pour les applications industrielles recherchées. Le meilleur caoutchouc provient d'*Hevea brasiliensis*, seule espèce largement cultivée et commercialisée au monde (Archer and Audley, 1987).

L'hévéa est conforme au modèle architectural de Rauh dont la caractéristique principale est une croissance rythmique par unité de croissance successive. Chez les jeunes plants, un nouvel étage foliaire ou "**flush**" est émis toutes les six semaines environ. Les feuilles d'un même étage sont au nombre de cinq en moyenne, chaque feuille étant composée de trois folioles allongées, disposées à l'extrémité d'un long pétiole. Le cycle de développement d'un "flush" s'effectue en quatre **stades foliaires** successifs (Hallé and Martin, 1968 ; **Figure 8**). Le stade A débute par le débourrement et l'apparition d'une nouvelle unité de croissance. Puis, au stade B les entre-nœuds s'allongent, les feuilles nouvellement formées sont pendantes et anthocyaniques. Le stade C correspond à la phase de maturation, les feuilles grandissent, prennent une couleur verte mais sont toujours dirigées vers le sol. Enfin, au stade D (dormance), les feuilles se redressent et se durcissent.

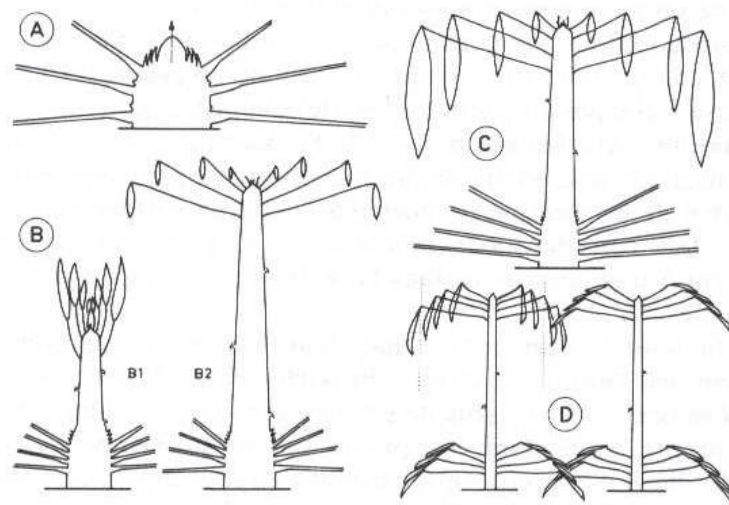


Figure 8 – Stades foliaires de l'hévéa au cours du développement d'une unité de croissance
 Stade A : Débourrement, Stade B : Croissance, Stade C : Maturation, Stade D : Dormance.
 Extrait de Hallé et Martin (1968).

Au bout de cinq à sept ans, l'hévéa atteint sa **maturité phénologique** : il perd et renouvelle ses feuilles chaque année de manière synchronisée lors de la saison sèche. La mise en saignée coïncide approximativement avec cette maturité phénologique, et elle correspond également, dans les conditions habituelles de culture, à la fermeture de la canopée. La **récolte** du latex débute lorsque la circonférence du tronc atteint en moyenne 50 cm de diamètre à 1 m du sol. Cette norme très répandue correspond approximativement à une taille pour laquelle la production initiale couvre au moins les frais d'exploitation. La **saignée** (incision de l'écorce de l'arbre) est renouvelée régulièrement, en général tous les 2 à 5 jours, pendant toute la durée d'exploitation de l'arbre, soit de 25 à 35 ans. En plantation, les hévéas atteignent généralement une hauteur comprise entre 20 et 25 mètres (**Figure 9**), bien qu'ils puissent mesurer jusqu'à 40 mètres en forêt. Le système racinaire de l'hévéa est constitué d'un pivot profond et de racines latérales. C'est une plante monoïque dont les fleurs mâles et femelles sont associées sur des inflorescences de type racème. La pollinisation est principalement entomophile et secondairement anémophile. Le fruit, déhiscent, est une capsule à trois loges contenant chacune une graine.



Figure 9 – L'hévéa, de l'arbre à la graine

A, plantation ; B, feuilles à trois folioles ; C, fruit à trois loges ; D, graines.

Les variétés d'hévéas cultivées sont des **clones** obtenus par **greffage** de bourgeons axillaires de feuilles sur des porte-greffes issus de graines d'hévéa. Cette technique permet de multiplier en masse et à l'identique des génotypes élités sélectionnés pour leurs qualités agronomiques telles que la production de latex ou la résistance à des maladies et à des stress environnementaux. Ces génotypes élités sont conservés dans des "jardin à bois" en vue de fournir les greffons qui seront greffés sur les porte-greffes en pépinière. Ainsi, les parties aériennes, dans une plantation monoclonale, sont génétiquement homogènes alors que les systèmes racinaires sont hétérogènes.

2.1.2. Hévéaculture

2.1.2.1. Domestication de l'hévéa

L'hévéa est originaire d'**Amérique du Sud**, plus précisément du bassin amazonien. Le Brésil a eu le monopole de la production de caoutchouc "natif" (à partir d'arbres sauvages de la forêt, saignés par des 'seringuos') jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, avant que l'hévéa ne soit domestiqué en **Asie** du sud et du sud-est, puis en **Afrique de l'Ouest**.

C'est l'Anglais Henry Wickham qui, en 1876, rapporta au jardin botanique royal de Kew Garden à Londres 70 000 graines d'hévéa collectées au Brésil, dont seulement 4% germeront. L'année suivante, les vingt-deux plants d'hévéa expédiés de Kew et arrivés à Singapour en juin 1877 constituent l'origine de presque toutes les plantations d'Asie et d'Afrique (Wycherley, 1959; Compagnon, 1986). Nous savons en fait qu'une quantité beaucoup plus importante de plants était arrivée à Ceylan (actuellement Sri Lanka) une année plus tôt. A partir de Singapour, la mise au point des techniques et le début de la multiplication de l'hévéa ont d'abord été réalisés en Malaisie et en Indonésie, préparant le développement des premières plantations dans la période 1895-1905. Les premières productions de caoutchouc de plantation ont alors été obtenues à Ceylan vers 1900 (Webster and Baulkwill, 1989). Le développement de l'hévéaculture s'étend ensuite en Inde et en Thaïlande. Les premières graines arrivent au Vietnam depuis Ceylan en 1897 et les plantations démarrent à partir de 1907.

En Afrique, l'hévéa a été introduit au Ghana en 1893, en Guinée en 1898 et au Congo belge (actuellement République Démocratique du Congo) en 1897-1898. L'hévéaculture est développée au Libéria, au Nigéria et au Cameroun au début du 20^{ème} siècle. A partir de 1925, la société Michelin et d'autres sociétés investissent à grande échelle en Indochine jusqu'à la fin de la présence française en 1954 (Panthou, 2013). A partir de ce moment, les planteurs français se réinstallent en Afrique de l'Ouest et centrale.

Aujourd'hui, la filière du caoutchouc naturel fait vivre 30 millions de personnes dans le monde (<https://www.wwf.fr/projets/developper-une-filiere-de-caoutchouc-naturel-durable-en-indonesie>), dont 6 millions sur les plantations. L'hévéaculture est parfois l'activité principale de grandes régions comme le sud de la Thaïlande. A l'échelle mondiale, les plantations de petite taille (de 2 à 10 hectares) sont largement majoritaires par rapport aux moyennes plantations (de 10 à 500 hectares) et aux plantations industrielles (de 500 à 15 000 hectares), puisqu'elles représentent 85% des surfaces cultivées en hévéa. Dans les grands pays producteurs d'Asie, la valorisation du bois d'hévéa (rubberwood) comme produit secondaire obtenu lors de l'abattage des parcelles âgées vient s'ajouter à celle du caoutchouc naturel, donnant lieu à une industrie de sciage et de fabrication de petit mobilier, ou de panneaux de particules. En Afrique, le bois d'hévéa est pour l'instant valorisé comme bois d'énergie pour la cuisine.

2.1.2.2. La production et consommation de caoutchouc naturel

En 2017, l'hévéaculture a produit environ **13,1 millions de tonnes** de caoutchouc naturel (d'après l'IRSG, International Rubber Study Group ; **Figure 10**), sur **13,5 millions d'hectares** de terres cultivées (Warren-Thomas *et al.*, 2015 ; **Figure 11**).

La **production mondiale** de caoutchouc naturel est assurée à **91%** par l'**Asie**, représentée majoritairement par la Thaïlande (36%) et l'Indonésie (25%). La Thaïlande est le premier producteur mondial avec plus de 2 millions d'hectares d'hévéa cultivés. Les autres grands pays producteurs de caoutchouc naturel asiatiques sont le Vietnam (8%), la Malaisie (6%), la Chine (6%) et l'Inde (5%) possédant chacun environ 1 million d'hectares. L'**Afrique** représente **6%** de la production mondiale de caoutchouc naturel, avec des plantations dans les pays suivants : Côte d'Ivoire (4%), Nigéria, Libéria, Cameroun, Ghana, Gabon, République Démocratique du Congo et Guinée (autres Afrique 4%). La Côte d'Ivoire est le plus gros producteur africain avec 480 000 tonnes par an pour une surface plantée de 530 000 hectares. L'**Amérique du Sud** (principalement Brésil et Guatemala, ainsi que Colombie, Pérou et Mexique) ne constitue que **3%** de la production mondiale de caoutchouc naturel alors que l'Amazonie est le centre d'origine du genre *Hevea*. L'une des raisons de ce paradoxe est la présence d'une maladie fongique des feuilles dévastatrice qui touche toutes les zones favorables à la culture de l'hévéa : la SALB (South American Leaf Blight) provoquée par le champignon *Microcyclus ulei* (récemment renommé *Pseudocercospora ulei*). Cette maladie est un véritable fléau pour l'hévéaculture, pour l'instant confiné au continent américain, mais qui fait peser une grave menace sur l'hévéaculture mondiale en cas d'introduction accidentelle en Asie.

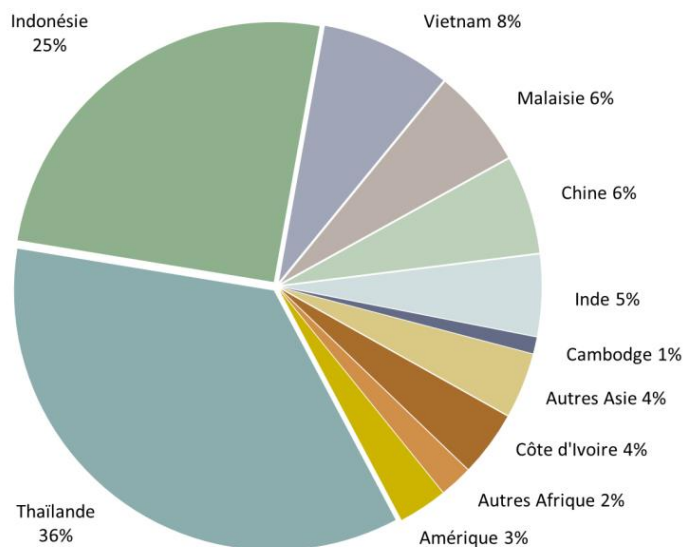


Figure 10 – Production mondiale de caoutchouc naturel en 2017, d’après l’IRSG

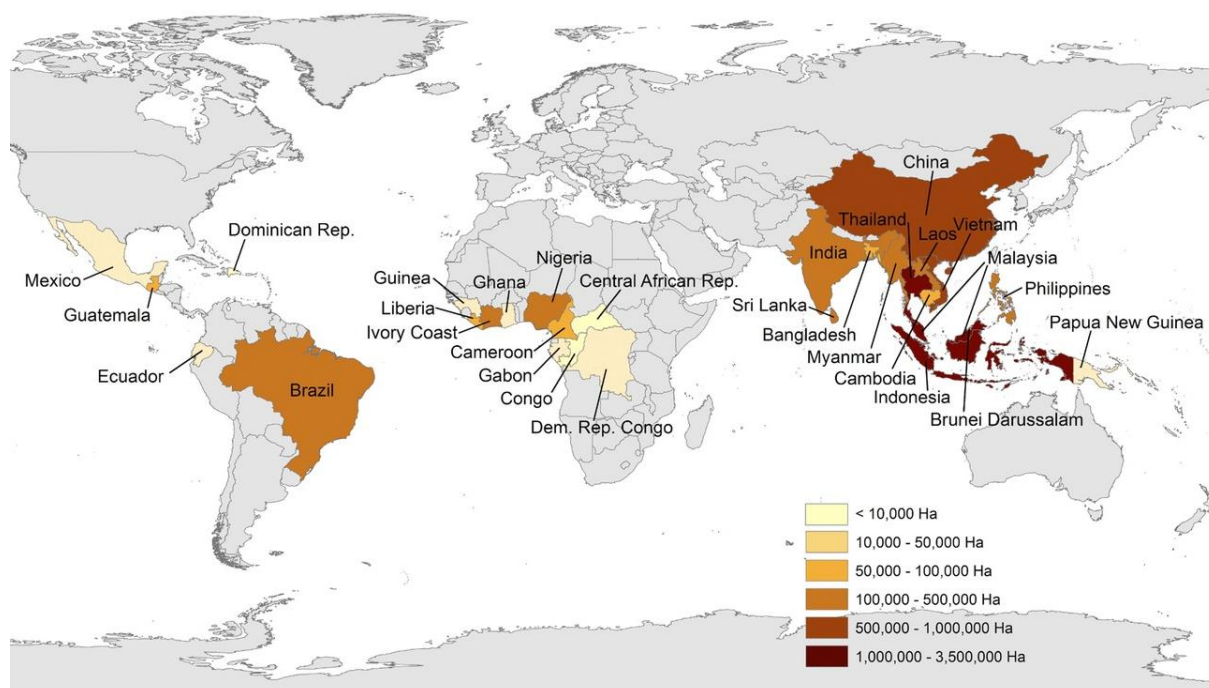


Figure 11 – Superficie (en hectares) des cultures d’hévéa à travers le monde, d’après Warren-Thomas *et al.* (2015)

La **consommation mondiale** de caoutchouc naturel a été d’environ 12 millions de tonnes en 2016 (<http://www.siph.com>). L’Asie est le plus gros demandeur avec 8 millions de tonnes consommées chaque année dont la moitié en Chine. Les autres gros consommateurs sont l’Europe et l’Amérique du Nord (1 million de tonnes par an chacun). Les trois grands pneumatiquiers, Michelin, Bridgestone et Goodyear consomment environ 50 % de la production.

2.1.2.3. Utilisations du caoutchouc naturel

Le **caoutchouc naturel** est un agro-matériau assez emblématique de ce qu'on appelle la "chimie verte". Il représente 35% du latex frais récolté par la saignée. Après coagulation et séchage, il comprend 87 à 94% de chaînes de poly-isoprène ainsi que des protéines, des lipides, des carbohydrates et d'autres substances. L'**élasticité** est sa caractéristique essentielle mais il possède d'autres propriétés physico-chimiques remarquables comme le pouvoir collant, la résistance à l'usure et à l'échauffement, et en particulier la cristallisation sous tension qui le rend résistant aux déchirures et le différencie de ce fait des caoutchoucs synthétiques. Il était utilisé depuis des centaines d'années par les Amérindiens pour confectionner divers objets comme des balles ou des torches. A l'état naturel, ses propriétés se dégradent assez rapidement, ce qui a d'abord rendu son utilisation industrielle problématique. En effet, il est cassant par temps froid et collant au soleil. Il a fallu attendre l'invention de la **vulcanisation** par Charles Goodyear en 1839 pour obtenir une stabilisation des qualités de ce matériau. Il s'agit d'un procédé consistant à chauffer le latex en présence de soufre, ce qui génère l'addition de ponts disulfures entre les longues chaînes de carbone du polymère. Ce procédé préserve la durabilité de l'élasticité du matériau. Il possède également une plus grande résistance aux changements de température. Le caoutchouc naturel vulcanisé a de nombreuses applications. Il est utilisé à 70% par l'**industrie pneumatique**, et plus particulièrement dans le secteur des poids lourds, des engins de génie civil et de l'aviation. Il entre également dans la composition d'objets du quotidien tels que des gants médicaux, des élastiques, des semelles, des bottes, des préservatifs, des couvertures, des tétines...

Le caoutchouc naturel représente environ 46% du marché du caoutchouc, le reste correspondant au **caoutchouc synthétique** fabriqué à partir du pétrole (<http://www.siph.com>). Il existe différents types de caoutchoucs synthétiques fabriqués à partir d'isobutylène, d'isoprène, de styrène ou encore d'acrylonitrile. Le caoutchouc naturel et les caoutchoucs synthétiques sont à la fois complémentaires par leurs propriétés différentes, et plus ou moins concurrents selon les conditions variables du marché. La fabrication d'un pneu associe presque toujours les deux types de caoutchouc en proportions variables (notamment : caoutchouc synthétique sur la bande de roulement, caoutchouc naturel sur les flancs du pneu). Les premiers caoutchoucs synthétiques ont été mis au point par des chimistes allemands pendant la première guerre mondiale, et le besoin d'un caoutchouc substitutif au caoutchouc naturel est réapparu pendant la seconde guerre mondiale, alors que l'approvisionnement de l'Europe et des États-Unis en caoutchouc naturel était empêché par la domination japonaise au sud-est de l'Asie. Après la fin de la guerre, on a pensé que le caoutchouc synthétique allait éliminer définitivement le caoutchouc naturel dont la part était passée en dessous de 30 % du total des élastomères dans les années 1950. Cependant le caoutchouc naturel a repris de l'importance du fait de ses qualités techniques spécifiques, et l'avenir de sa production n'est pas mis en question. En revanche, l'extension des surfaces de

plantation pose des questions environnementales du fait de la compétition avec d'autres cultures pour l'usage de la terre (cultures alimentaires en particulier), et de la nécessité de mieux protéger les forêts et les espaces naturels. Il y a donc un besoin d'amélioration de la productivité des plantations existantes pour répondre à la demande du marché tout en limitant le recours aux extensions, besoin qui passe notamment par la protection des arbres contre les maladies fongiques des feuilles telles que la maladie 'Corynespora Leaf Fall' due à *Corynespora cassicola*.

2.1.3. Physiologie de la production de caoutchouc naturel

Le **latex** est le cytoplasme des cellules spécialisées de l'écorce de l'hévéa, nommées **cellules laticifères** (Andrews and Dickenson, 1961; Hébant, 1981). Ces dernières sont émises à partir du cambium en couches monocellulaires successives appelé **manteaux laticifères** (Figure 12). Les cellules d'un même manteau sont anastomosées entre elles de manière à former un réseau dans les tissus du phloème mais cependant distinct des vaisseaux où circulent la sève. On parle aussi de **canaux laticifères**, formant un continuum allant des racines jusqu'aux feuilles. Cette caractéristique générée par l'évolution est particulièrement importante puisqu'elle permet un écoulement prolongé du latex sur l'encoche de saignée.

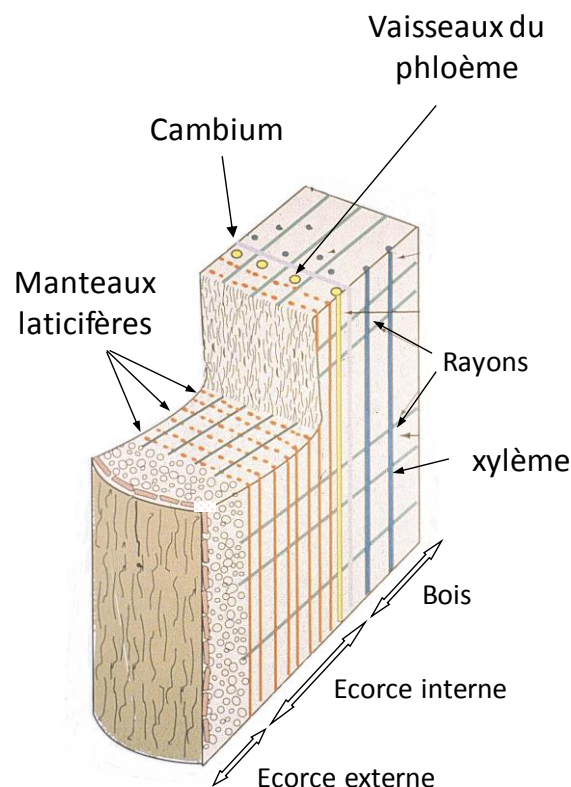


Figure 12 – Anatomie d'un tronc d'hévéa

Les cellules laticifères, spécialisées dans la synthèse du caoutchouc, sont organisées en couches monocellulaires concentriques appelées manteaux laticifères. Anastomosées entre elles, elles forment les canaux laticifères, distincts des vaisseaux phloémiens qui sont situés en profondeur dans l'écorce, à proximité du cambium, et qui ne sont donc en principe pas touchés par la saignée.

Les cellules laticifères contiennent tous les organites habituels d'une cellule végétale ainsi que des organites spécifiques tels que des particules de caoutchouc, des lutoïdes et des particules de Frey-wyssling.

Les **particules de caoutchouc** sont constituées de polymères de cis-1,4-polyisoprène entourés d'une couche de phospholipoprotéines chargée négativement (Gomez and Moir, 1979). Elles représentent environ 30 à 50 % de la masse totale du latex. La synthèse du cis-1,4-polyisoprène a pour précurseur le saccharose produit par la photosynthèse (Archer and Audley, 1987; Yamashita *et al.*, 2016). Ce sucre est hydrolysé en glucose et en fructose, eux-mêmes métabolisés en pyruvate par la glycolyse, puis en acétyl-CoA *via* le complexe pyruvate déshydrogénase. Ceci fournit le pyrophosphate d'isopentényle (PPI), précurseur de la biosynthèse du cis-1,4-polyisoprène.

Les **lutoïdes** sont des vacuoles avec un pH acide qui joueraient un rôle important dans l'arrêt de l'écoulement du latex. En effet, ils contiennent des facteurs de coagulation (cations et protéines) qui, en cas de rupture, interagissent avec les particules de caoutchouc provoquant la coagulation du latex (D'Auzac *et al.*, 1982). Au moins 169 protéines ont été extraites à partir des lutoïdes (Wang *et al.*, 2013) dont l'**hévéine** qui représente 20% de la matière sèche du culot lutoïdique (Berthelot *et al.*, 2016). Les protéines de la famille des hévéines sont des lectines appartenant à la famille des PR4 (Pathogenesis-Related) présentant des activités anti-microbiennes et anti-fongiques (van Parijs *et al.*, 1991; Soedjanaatmadja *et al.*, 1995; Berthelot *et al.*, 2016).

Les **particules de Frey-wyssling** sont des plastes modifiés renfermant de nombreuses inclusions lipidiques riches en caroténoïdes dont le rôle n'est pas encore clairement établi (Frey-Wyssling, 1932). Il semblerait que ces particules fournissent du PPI *via* une autre voie que celle décrite précédemment, chez les clones riches en caroténoïdes (Chow *et al.*, 2012).

La **saignée** consiste à inciser l'écorce de l'arbre de manière à sectionner les canaux laticifères et permettre ainsi l'écoulement du latex le long de l'encoche de saignée jusqu'à la tasse de collecte (**Figure 13**). Lors de cette saignée, une partie des organites des cellules laticifères est expulsée, à l'exception du noyau et des mitochondries. Ces derniers sont nécessaires à la régénération du contenu cellulaire exporté (D'Auzac *et al.*, 1997). Au bout d'un certain temps, les particules de caoutchouc coagulent au niveau de l'encoche de saignée, formant une barrière protectrice empêchant toute intrusion extérieure. Pour la plante, le latex pourrait agir comme un pansement protégeant une blessure jusqu'à sa cicatrisation. En effet certaines protéines du latex (chitinasés et autres protéines PR, notamment l'hévéine) ont été montrées comme jouant un rôle dans la défense contre des insectes herbivores et des agents pathogènes (Konno, 2011).



Figure 13 – Récolte du latex de l'hévéa

Le latex se récolte en pratiquant une saignée dans l'écorce de l'arbre (A), qui s'écoule ensuite le long de l'encoche avant d'être recueilli dans une tasse (B). Source : <https://thinglishlifestyle.com/>.

2.1.4. Maladies foliaires de l'hévéa causées par des champignons

Les paramètres importants de la production du caoutchouc naturel sont la durée de l'écoulement et la capacité de régénération du latex (synthèse *de novo* du latex expulsé), qui dépend entre autres de l'approvisionnement en sucre des cellules laticifères, donc de la photosynthèse et/ou de la mobilisation des réserves carbonées. Les maladies foliaires peuvent être une cause importante de baisse des rendements dans la mesure où elles engendrent des **défoliations massives et/ou répétées** qui affectent la photosynthèse. Chez l'hévéa, les maladies des feuilles sont majoritairement cryptogamiques (i. e. causée par des champignons). L'incidence des différents pathogènes fongiques rencontrés varie selon la localisation géographique.

En Amérique du Sud, la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa (**SALB**) a considérablement limité le développement de l'hévéaculture (Lieberei, 2007). Le champignon responsable de cette maladie, *Microcyclus ulei*, provoque des symptômes différents selon l'âge de la feuille au moment de l'infection. Sur les jeunes feuilles de l'arbre, il engendre des lésions gris-sombre accompagnées d'une déformation du limbe correspondant à la production de conidies asexuées (**Figure 14-A**). A un stade plus avancé, on voit se former sur la face supérieure des feuilles des petits amas noirs disposés en cercle de quelques millimètres de diamètre appelés stromas. Ils sont constitués de périthèces, structures reproductrices produisant les ascospores (sexuées), et de pycnidiospores produisant les pycnides (asexuées). Pour le moment, cette maladie est présente seulement sur le continent américain.

Les maladies foliaires causées par des champignons des genres *Colletotrichum*, *Oidium* et *Phytophthora* sévissent dans toutes les zones d'hévéaculture. Les attaques de *Colletotrichum sp*, responsable de l'**anthracnose**, peuvent se produire toute l'année, mais les jeunes feuilles d'hévéa au stade B, formées au moment de la refoliation annuelle, sont les plus sensibles. Les feuilles se

recroquevillent, deviennent rugueuses au toucher et on voit apparaître des lésions entourées d'un halo jaune (**Figure 14-B**). L'*Oidium heveae* s'attaque également aux jeunes feuilles d'hévéa, qui se retrouvent recroquevillées et recouvertes de tâches blanchâtres (**Figure 14-C**). La maladie Oïdium semble présente surtout en Asie. Enfin, *Phytophthora palmivora* attaque surtout les pétioles des feuilles matures, donnant une impression de brûlure sur les feuilles tombées au sol (**Figure 14-D**). Ce champignon peut également être retrouvé au niveau des panneaux de saignées causant la maladie dite des "raies noires" du tronc.

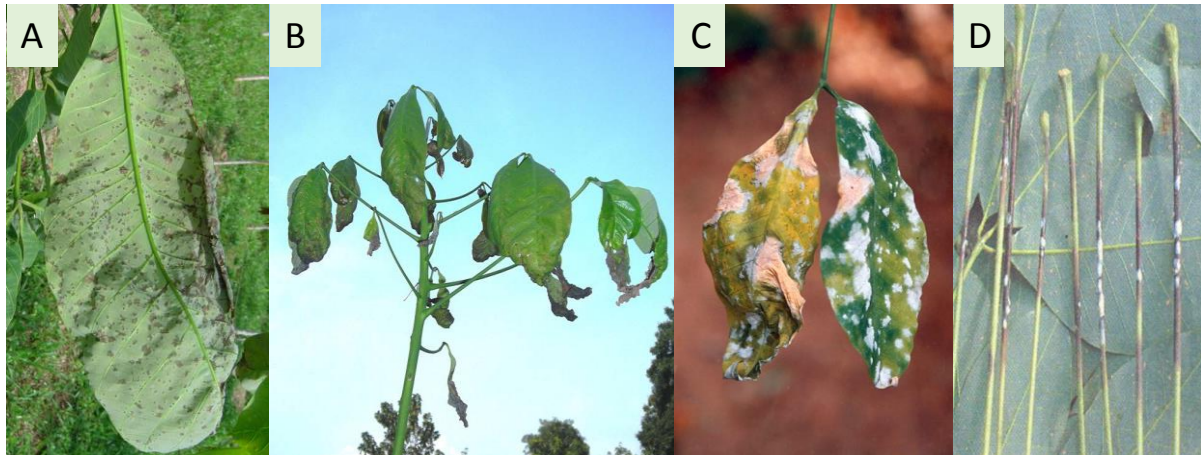


Figure 14 – Symptômes foliaires provoqués par différents champignons pathogènes de l'hévéa

A, face inférieure d'une feuille d'hévéa couverte de lésions de *M. ulei*, champignon responsable de la SALB (thèse de Vincent Leguen) ; B, jeunes feuilles d'hévéas recroquevillées suite à une attaque de *Colletotrichum sp* (<http://rubberdisease.blogspot.com/>) ; C, tâches blanchâtres provoquées par *Oidium heveae* (ressource d'images de l'American Phytopathological Society) ; D, pétioles brûlés par *Phytophthora palmivora* (guide du conseiller agricole hévéa – tome 4).

En Asie et en Afrique, *Corynespora cassicola* est responsable de la maladie 'Corynespora Leaf Fall' (CLF) qui se manifeste sous forme d'épidémies touchant encore peu de clones mais qui semble en constante progression (Manju *et al.*, 2010; Jayasinghe, 2003). Les symptômes caractéristiques sont des **nécroses** foliaires plus ou moins circulaires, pouvant prendre différents aspects selon le clone et/ou la maturité des feuilles (**Figure 15**). Elles peuvent être associées à une chlorose périphérique plus ou moins importante (**Figure 15-A**). Certaines de ces lésions sont très brunes et présentent en leur centre un aspect desséché légèrement blanchâtre (**Figure 15-B**). D'autres provoquent des noircissements de nervures donnant sur des folioles matures un aspect caractéristique dit en "arête de poisson" (fishbone) ou en "voie de chemin de fer" (railway track) (**Figure 15-C**). Ces différents types de nécroses ne sont pas exclusifs et peuvent se retrouver sur la même feuille. Dans certains cas, les feuilles des clones les plus sensibles peuvent jaunir entièrement, se dessécher puis tomber (**Figure 15-D**). C'est le symptôme le plus extrême de la maladie. Les pertes économiques liées à cette maladie peuvent être très importantes, en raison

d'une érosion progressive des rendements, d'une détérioration de l'état général des arbres, des perturbations liées aux tentatives de traitement, ou des pertes liées à la décision d'arracher les clones les plus sensibles.



Figure 15 – Principaux symptômes de la maladie CLF chez l'hévéa

A, petites nécroses circulaires associée à une chlorose périphérique ; B, nécroses brun foncé présentant un aspect cartonneux au centre ; C, noircissement de nécroses ; E, défoliation totale du clone sensible RRIC103 (gauche) comparé au clone GT1 tolérant (droite).

2.1.5. Méthodes de lutte contre les maladies fongiques

Comme nous venons de le voir, la chute des feuilles provoquée par des maladies fongiques représente un enjeu économique important pour les planteurs d'hévéa. Il est donc essentiel de disposer de méthodes de lutte efficaces permettant de stopper ou du moins limiter le développement de ces maladies.

Une méthode fréquente de lutte contre les champignons phyto-pathogènes, notamment pour les cultures annuelles à faible développement en hauteur, est l'utilisation de **fongicides**. Efficaces pour limiter la maladie en pépinières, les fongicides ne sont utilisés dans les plantations d'hévéa que lors d'attaques sévères à cause de leur coût d'épandage élevé (nécessité de traiter en hauteur,

souvent par traitements aériens) et de leur impact sur l'environnement. Les équipements d'épandage sont souvent lourds. Il est difficile d'atteindre le haut de la canopée en pulvérisant depuis le sol. Quant à l'épandage par avion, il reste bien souvent inaccessible pour les petites exploitations. Le plus souvent, l'application de fongicides est curative car on ne détecte pas de grosses épidémies tous les ans et celles-ci ne touchent pas toujours les mêmes clones.

Il existe des traitements préventifs qui consistent à provoquer une **défoliation artificielle** par l'épandage d'éthylène sous forme d'éthéphon. Cette méthode est surtout utilisée pour lutter contre l'anthracnose (Guyot *et al.*, 2001). Son but est d'avancer la date de refoliation de l'hévéa afin qu'elle ne coïncide pas avec la saison des pluies, favorable au développement de *Colletotrichum sp.* Pendant cette période à risque, les feuilles d'hévéa ont dépassé le stade de développement B où elles sont le plus sensibles.

La lutte contre la maladie SALB peut passer par une **stratégie d'évitement** consistant à diminuer le risque de contact entre l'hôte et l'agent pathogène. En effet, certaines plantations d'hévéa d'Amérique du Sud ont migré progressivement vers des régions où les conditions climatiques, plus froides et sèches, sont défavorables au développement de *Microcyclus ulei*. De plus, des antagonistes fongiques de *M. ulei* ont été recherchés parmi les endophytes de l'hévéa (Rocha *et al.*, 2011). Le but étant d'identifier des nouvelles molécules bio-actives permettant de lutter efficacement contre la SALB (**lutte biologique**), mais sans succès jusqu'ici.

Enfin, la **création variétale** est considérée comme une méthode très satisfaisante lorsqu'elle permet d'obtenir des variétés durablement résistantes. La diversification clonale à l'échelle d'une plantation est en principe un moyen de limiter les risques et l'ampleur d'attaques possibles mais non prévisibles. En cas d'attaques, la sélection permet le remplacement des clones les plus sensibles (éliminés par arrachage) par des clones résistants. Cela permet de maintenir un niveau de productivité satisfaisant tout en réduisant la pression de l'inoculum pathogène. L'IFC a initié en 2011 un programme de création variétale en Afrique de l'Ouest visant à produire des clones d'hévéa présentant à la fois de bonnes performances de production et une bonne tolérance à la maladie CLF qui constitue une des principales menaces sanitaires pour l'hévéa dans cette région du monde.

2.2. *Corynespora cassiicola*

2.2.1. Description générale

Corynespora cassiicola (Berk. & M. A; Curtis) C. T. Wei est un champignon **Ascomycète**, appartenant à la classe des Dothideomycètes et à l'ordre des Pléosporales, dont le genre compte une centaine d'espèces (Schoch *et al.*, 2009). Il présente une **gamme d'hôtes très large** comprenant plus de 500 espèces de plantes (Farr and Rossman, 2016), dont certaines espèces telles que l'hévéa, le coton, le soja, le concombre et la tomate présentent un gros enjeu économique (Chee, 1990; Lakshmanan *et al.*, 1990; Koenning *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Schlub *et al.*, 2009). *C. cassiicola* peut également être pathogène de certains nématodes (Carris *et al.*, 1986), d'éponges (Zhao *et al.*, 2015) et peut même provoquer, très rarement, des mycoses chez certains patients immunodéprimés (Huang *et al.*, 2010; Mahgoub, 1969; Yan *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2013). Il a été trouvé dans presque tous les organes des plantes hôtes : feuilles, tiges, pétioles, fleurs, fruits et racines. Même si *C. cassiicola* est principalement décrit comme un **pathogène nécrotrophe**, des isolats ont été retrouvés dans des tissus asymptomatiques et sont donc qualifiés d'**endophytes** (Collado *et al.*, 1999; Promputtha *et al.*, 2007; Gond *et al.*, 2007; Suryanarayanan *et al.*, 2011), ou encore dans des débris végétaux et donc considérés comme **saprophyte** (Lee *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2006). Chez l'hévéa, les spores de souches isolées à partir de feuilles saines prélevées au Brésil ont été ré-inoculées sur leur hôte d'origine en conditions contrôlées (Déon *et al.*, 2012b). Il s'est avéré que certaines d'entre elles induisaient des symptômes modérés cinq jours après inoculation, suggérant que ces souches pourraient être des pathogènes latents sur les plantations d'hévéa brésiliennes où la maladie CLF n'est pas encore déclarée.

Dans le **cycle de développement** classique d'un champignon, la production et la libération des spores constituent une étape cruciale pour le devenir de l'interaction avec l'hôte. Chee (1988) a montré, à travers des études de piégeage de spores sur plantations d'hévéa, que la libération des spores de *C. cassiicola* commençait dès 8h du matin, atteignait un pic à 12h avant de chuter à un niveau très bas le soir. Ces spores sont ensuite dispersées par le vent, l'eau, l'homme ou l'animal jusqu'aux feuilles de la plante permettant d'initier le cycle infectieux. Un temps humide ou nuageux avec des pluies modérées tout au long de la journée et une température de l'air comprise entre 26 et 29°C sont les conditions climatiques favorables à la germination des spores et de manière générale au développement de *C. cassiicola*. Chaque spore produit un ou plusieurs tubes germinatifs à son extrémité (**Figure 16-A et B**). Eux-mêmes sécrètent une matrice fibrillaire (**Figure 16-C et D**; Breton *et al.*, 1997) qui joue un rôle dans l'adhésion à la surface foliaire de l'hôte et dans la pénétration du champignon grâce à la sécrétion d'enzymes (cutinases et pectinases) dégradant la cuticule et les parois cellulaires de l'hôte (Chee, 1988). La colonisation

par le mycélium serait intracellulaire. En conditions contrôlées, les premiers symptômes apparaissent entre 24h et 48h après le contact des spores avec la plante hôte (Breton *et al.*, 2000). Dans le cas d'une interaction compatible avec l'hôte, l'invasion des tissus est associée à la mort d'un grand nombre de cellules. Les feuilles très malades peuvent se détacher de l'arbre et alimenter la litière du sol, alors que d'autres résisteront à la défoliation mais garderont des symptômes jusqu'à la défoliation naturelle de l'arbre.

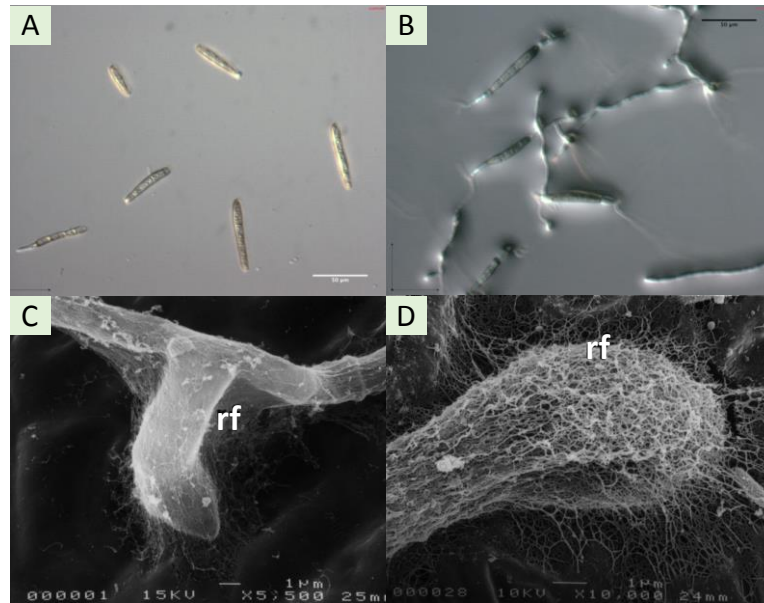


Figure 16 – Germination des spores de *C. cassiicola*

A et B, Observation en microscopie optique des spores de *C. cassiicola* à des stades plus ou moins avancé de germination (échelle : 50 μm).

C et D, Observation en microscopie électronique à balayage du tube germinatif, émis par les spores de *C. cassiicola*, enveloppé d'un réseau fibrillaire (rf) montrant un fort attachement à la surface de la feuille (échelle : 1 μm).

Extrait de la thèse de Tran Dinh Minh (2016) et de Breton *et al.* (1997).

Dans les plantations d'hévéas asiatiques (Inde), la maladie CLF causée par *C. cassiicola* survient pendant la saison sèche juste après refoliation (janvier-février) et persiste pendant toute la période chaude et humide (mars à mai) avec un pic d'intensité en mars (Manju *et al.*, 2014 ; **Figure 17**). De juin à décembre, le champignon doit survivre durant cette période qui est défavorable à son développement. Il a été montré que *C. cassiicola* subsiste 11 jours dans la litière fraîche mais pourrait aussi demeurer le reste de l'année dans les feuilles infectées mais non tombées de l'arbre ou dans des brindilles sèches infectées (Manju *et al.*, 2016). Ceci permet de maintenir la continuité du cycle de la maladie et de fournir l'inoculum primaire lors de la saison suivante. Chez certaines espèces fongiques, il peut arriver que la forme sexuée aide le champignon à survivre lors de saisons défavorables. Cependant, aucune forme sexuée de *C. cassiicola* n'a encore été identifiée à ce jour.

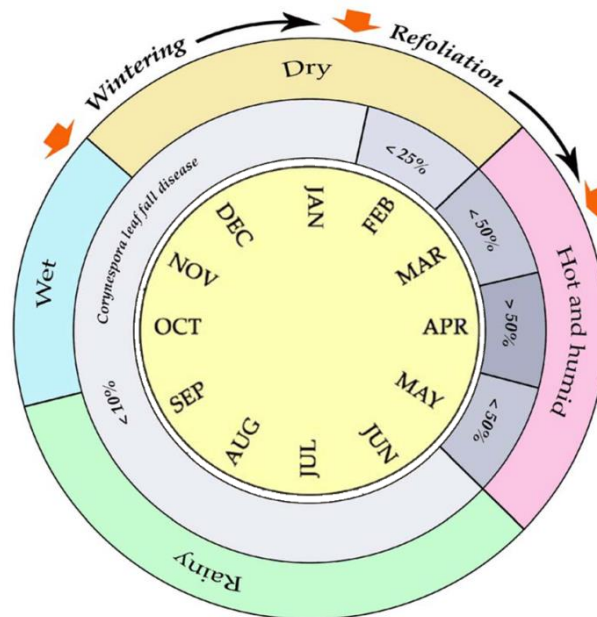


Figure 17 – Dynamique de la maladie CLF au cours d'une année sur une plantation d'hévéa, en Inde (Karnataka)

Juste après la refoliation de l'hévéa (janvier-février), la sévérité de la maladie CLF augmente (<25%) jusqu'à atteindre son maximum (>50%) entre mars et avril et reste modérée (<10%) de juin à décembre. On distingue quatre saisons sur les plantations asiatiques (Inde) : saison sèche (dry), saison chaude et humide (hot and humid), saison des pluies (rainy) et saison humide (wet). La défoliation a lieu entre novembre et décembre pendant la phase appelé hivernage sur le graphique (wintering). Extrait de Manju *et al.* (2014).

2.2.2. Bref historique de la maladie CLF chez l'hévéa

La maladie CLF a été **détectée pour la première fois** sur des jeunes plants **en pépinières** : en 1936 en Sierra Leone (Deighton, 1936), en Inde en 1958 (Ramakrishnan & Pillay, 1961) et en Malaisie en 1960 (Newsam, 1960). Puis, des apparitions sporadiques de la maladie ont été signalées sur différentes plantations d'arbres matures en Inde entre 1969 et 1976 (George & Edathil, 1980). La forme épidémique de la maladie affectant l'arbre adulte et causant des pertes significatives de rendement n'était pas connue avant 1985.

La **première épidémie sévère de CLF** sur plantations matures a eu lieu au **Sri Lanka**, commençant par une observation dans la pépinière de l'institut de recherche sur le caoutchouc en 1985 sur le clone RRIC103, et qui s'est étendue rapidement ensuite (Jayasinghe, 1997; Liyanage *et al.*, 1986). Après cette épidémie, une alarme au développement de *C. cassiicola* avait été lancée par l'IRRDB, et des signalements de CLF se sont multipliés en Asie : Malaisie 1990-1993 (Tan *et al.*, 1992), Indonésie 1990-1994 (Sinulingga and Soepena, 1996), Inde 1996 et 2015 (Manju *et al.*, 2015; Rajalakshmi and Kothandaraman, 1996), Vietnam 1999 (Dung and Hoan, 2000), Thaïlande 1999 (Chanruang, 2000), Chine 2006 (Jinji *et al.*, 2007).

En **Afrique**, les rapports concernant *C. cassiicola* proviennent exclusivement de communications fournies par les planteurs d'hévéas partenaires de l'IFC et les agronomes et chercheurs du CIRAD. Ces rapports impliquent principalement la Côte d'Ivoire, le Libéria, le Ghana et le Cameroun. Un historique plus détaillé de la maladie CLF est présenté en **Annexe 1**.

De manière synthétique, les **clones** considérés comme très **sensibles** à la maladie CLF en Afrique sont FX25, IAN873, IRCA18, IRCA631, IRCA707, KRS21, PB28/59, PB260, PB310, RRIC103, RRIC110, RRII105, RRIM725, RRIM802, RRIM921, RRIV2, RRIV3 et RRIV4. Les clones jugés **résistants** en champ sont GT1, IRCA41, IRCA331, IRCA427, et surtout RRIC100. Ce clone RRIC100 n'est jamais apparu affecté par *Corynespora* en champ, alors que les biotests réalisés en laboratoire, utilisant la toxine Cas1, indiquaient une forte sensibilité.

Selon les observations rapportées, il semblerait que certains clones soient sensibles à *C. cassiicola* dans un pays et tolérant ou résistant dans un autre (Jayasinghe, 2003 ; **Tableau 3**). C'est le cas par exemple de GT1 qui est décrit comme sensible en Malaisie et en Indonésie mais résistant dans les pays d'Afrique de l'Ouest (si l'on excepte l'observation d'attaque de GT1 sur la plantation de Lac en mars 2018). A l'inverse, le clone PB260 est décrit comme sensible en Afrique et tolérant/résistant en Asie (Malaisie, Indonésie, Thaïlande, Sri Lanka, Vietnam). Cette différence de sensibilité des clones sur les deux continents suggérerait l'existence de plusieurs souches de *C. cassiicola* possédant des spectres d'hôtes bien distincts. Mais on doit aussi garder une certaine prudence vis-à-vis des informations relatées, du fait des risques d'erreur sur l'identité des clones, des risques de confusion entre différentes maladies de feuilles, et du fait du caractère subjectif de certaines observations quant à l'importance des attaques.

Tableau 3 – Comportement de plusieurs clones d'hévéa face à la maladie CLF dans différents pays et continents, d'après Jayasinghe 2003

Clones	Inde	Malaisie	Indonésie	Afrique	Thaïlande	Sri Lanka	Vietnam
Avros 2037			R				
GT1		S	S	R	S	R	T
PB260		T	T	S	R	R	T
RRIM600		S	S	T			R
PB235		T	T		R		R
PR107	S	T					
PB217	T	T	T	S		R	
RRIC110		S	S		S	HS	
IAN873		HS	HS				
RRII105	S						
PR261			T				

HS, hautement sensible ; S, sensible ; T, tolérant et R, résistant.

2.2.3. Diversité des souches de *Corynespora cassiicola*

L'espèce *C. cassiicola* présente une très **grande diversité phénotypique**. Qi *et al.* (2011) ont montré qu'il existe des variations de couleur et de texture du mycélium, des variations de taille et de forme des conidies, entre des souches de *C. cassiicola* provenant de plantes différentes (hévée, concombre, papaye, tomate) mais aussi au sein d'une même souche (plasticité). Cependant, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la morphologie de *C. cassiicola* et son pouvoir pathogène ou sa spécificité d'hôte.

La **diversité génétique** de *C. cassiicola* a été largement étudiée à l'aide de marqueurs moléculaires de types RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), mais aussi à l'aide de l'analyse des séquences ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal du champignon et de trois loci codant les gènes *caa5*, *ga4*, et *act1* (Atan and Hamid, 2003; Déon *et al.*, 2014; Dixon *et al.*, 2009; Hieu *et al.*, 2014; Nghia *et al.*, 2010; Nghia *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 1998). Certaines de ces études ont trouvé une corrélation entre les groupes génétiques des souches de *C. cassiicola* et certaines caractéristiques telles que leur origine géographique, le génotype de la plante hôte, la virulence et la croissance du champignon. Par exemple, une étude de diversité génétique sur 21 isolats de *C. cassiicola* provenant de différents clones d'hévée en Malaisie a permis d'identifier deux groupes génétiques distincts au sein des souches (Nghia *et al.*, 2008). Les souches du groupe 1 étaient hautement virulentes sur les clones RRIM600, GT1 et IAN783 mais affectaient peu les clones RRIM2020 et PB260, tandis que les souches du groupe 2 présentaient un profil inverse (spécialisation clonale).

En **2009**, une **étude phylogénétique** portant sur 143 isolats de *C. cassiicola* issus de 68 espèces de plantes (dont l'hévée) d'origines géographiques variées, a été publiée (Dixon *et al.*, 2009). Cette analyse a été réalisée sur la base des séquences concaténées de quatre amplicons correspondant à quatre loci (ADNr *ITS*, *caa5*, *ga4*, et *act1*). Elle a permis de délimiter six clades phylogénétiques nommés PL1.1, PL1.2, PL1.3, PL2, PL3 et PL4. Seules les souches du clade PL1.1 présentaient une spécialisation d'hôte pour la papaye, alors que les autres avaient un éventail de plantes hôtes plus large. Des travaux antérieurs à cette thèse (Déon *et al.*, 2014), effectués dans le cadre du projet IFC-Corynespora, ont permis d'enrichir cette étude phylogénétique de 43 souches isolées à partir de feuilles d'hévée de différentes provenances géographiques (Philippines, Cameroun, Gabon, Inde, Sri Lanka, Thaïlande, Malaisie, Ghana), ainsi que 17 souches issues d'autres plantes (papaye, concombre et soja) provenant du Brésil. Elles ont été analysées conjointement avec 48 souches de l'étude Dixon, d'hôtes et de provenances géographiques variées, représentatives des six clades décrits précédemment (**Figure 18**). **Huit clades majeurs** ont été identifiés et nommés par des lettres, de A à H, dont certains ont

été divisés en sous-clades (A1 à A4, B1, B2 et F1 à F3). Le clade A rassemble le plus grand nombre de souches avec un sous-clade A1 constitué d'isolats provenant exclusivement de la papaye et des sous-clades A2, A3 et A4 représentées par des souches isolées à partir de feuilles d'hévéa prélevées en Thaïlande, au Gabon et en Asie (Malaisie, Sri Lanka et Inde), respectivement.

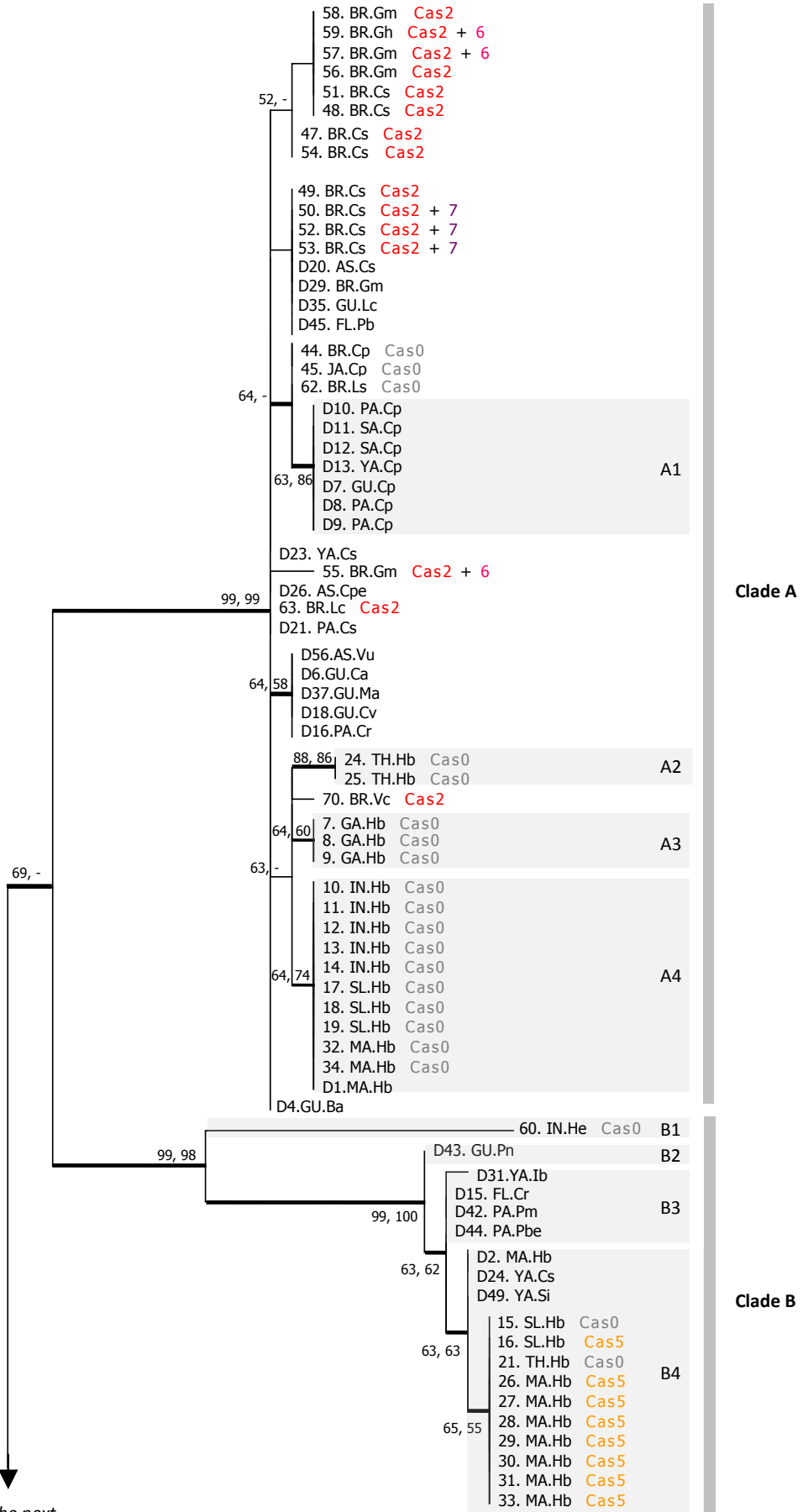
Très récemment, 37 souches de *C. cassiicola* représentatives de la diversité intra-espèce ont fait l'objet d'un séquençage de génome complet (Lopez *et al.*, 2018). Une nouvelle phylogénie, construite sur les séquences concaténées de 12 112 gènes communs et uniques, a permis de confirmer les grands groupes de la première phylogénie - établie sur quatre *loci* seulement (Déon *et al.* 2014,) - tout en affinant la classification. Ainsi un nouveau sous-clade appelé A5 est apparu (non identifié sur la **Figure 18**), composé de huit souches brésiliennes provenant du concombre (codes 47, 50, 51, 52, 53 et 54) ou du soja (codes 56 et 57). Deux souches camerounaises issues d'hévéa (codes 2 et 5) appartiennent dorénavant au clade D, la souche 69 (Brésil, *Piper hispidinervum*) au clade G et la souche 70 (Brésil, *Vernonia cinerea*) au clade sous-clade A4.

Figure 18 – Analyse phylogénétique des souches de *C. cassiicola* provenant d'hôtes et d'origines géographiques variés

L'arbre a été généré grâce à l'assemblage de 4 *loci* concaténés (*ITS*, *ga4*, *caa5* et *act1*), en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance. Seuls les groupes présentant des valeurs de bootstrap supérieures à 60 ont été identifiés comme des clades. La classe toxinique a été indiquée en couleur lorsqu'elle était connue. La souche D58.NE.Ts (*Corynespora olivacea*) a été utilisée pour enraciner l'arbre. Suite aux travaux de Lopez *et al.* (2018), les échantillons 50-BR-Cs, 52-BR-Cs et 53-BR-Cs ont été identifiés comme étant de classe toxinique Cas2+7. Les espèces hôtes ayant le plus d'effectifs sont : *Hevea brasiliensis* (Hb), *Carica papaya* (Cp), *Cucumis sativus* (Cs) et *Glycine max* (Gm). Les origines géographiques des souches sont les suivantes : Philippines (PH), Cameroun (CA), Gabon (GA), Inde (IN), Sri Lanka (SL), Thaïlande (TH), Malaisie (MA), Ghana (GH), Brésil (BR), Jamaïque (JA), Saipan (SA), Guam (GU), Palaos (PA), Yap (YA), Samoa américaines (AS), Floride (FL), Tennessee (TE), Pays-Bas (NE).

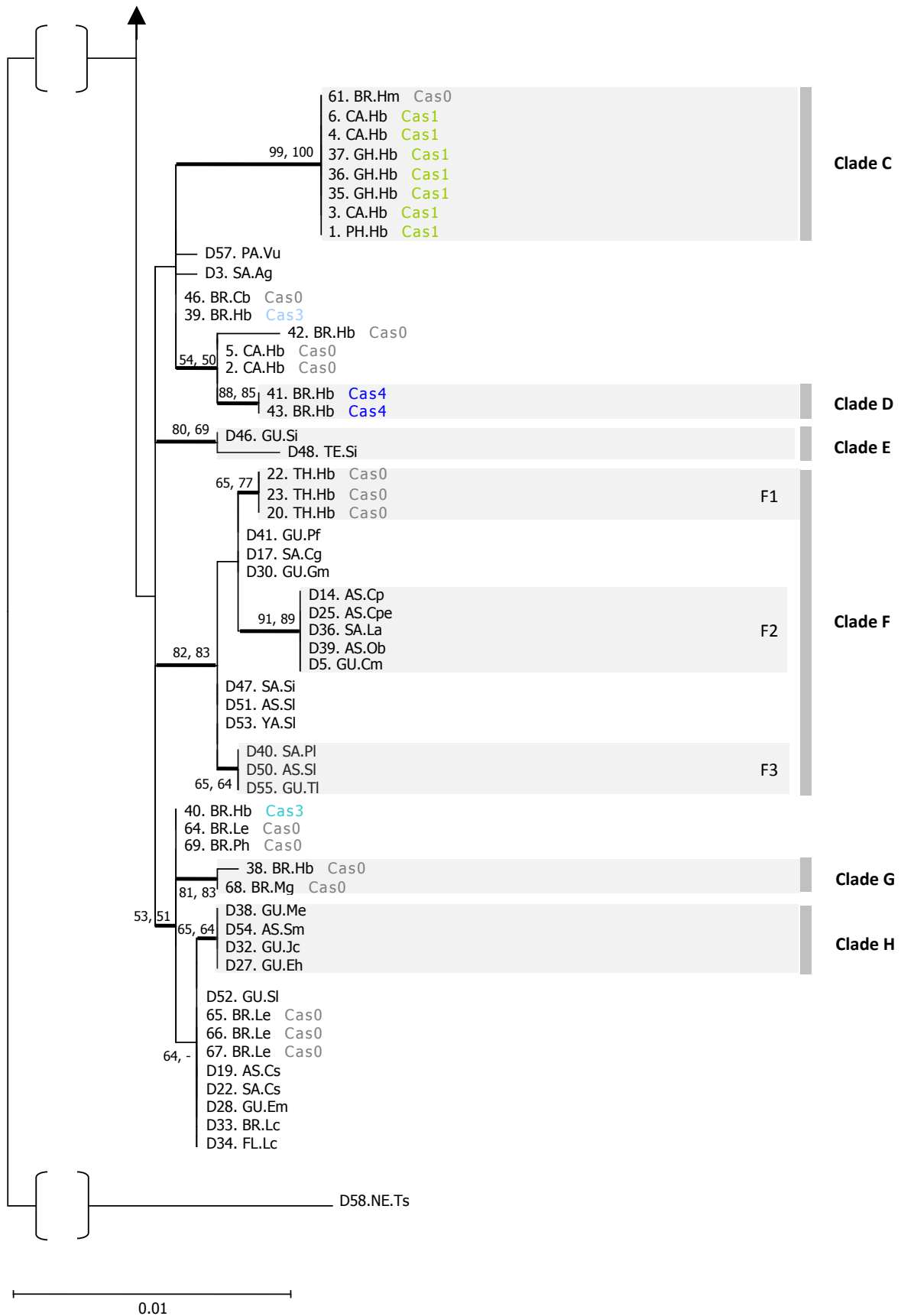
D'après Déon *et al.* (2014) et modifié suite aux travaux de Lopez *et al.* (2018).

Légende associée aux deux pages suivantes.



(Continued on the next

(Continued from previous page)



2.2.4. Les effecteurs de *Corynespora cassiicola*

2.2.4.1. Historique de la découverte de la cassiicoline Cas1

Les premiers travaux ayant mis en évidence la présence d'une toxine sécrétée par *C. cassiicola* ont été réalisés par **Onesirosan et al.** en **1975**. Les auteurs ont révélé que des isolats du champignon hautement pathogènes pour la tomate produisaient en milieu synthétique une toxine capable d'induire des symptômes sur des cultivars de tomates sensibles au champignon.

Vingt-deux ans plus tard, **Breton et al. (1997)** ont démontré l'implication d'une toxine de *C. cassiicola* dans l'interaction avec l'hévéa, à partir d'une souche virulente provenant des Philippines (souche CCP). En effet, des observations microscopiques d'épiderme de feuilles d'hévéa inoculées par la souche CCP ont montré que la majorité des cellules étaient dégénérantes bien en amont du front de développement du champignon, appuyant l'hypothèse de l'existence d'une toxine sécrétée par *C. cassiicola*, susceptible de diffuser de cellules en cellules. Pour tester la sensibilité des clones d'hévéa à cette toxine, les auteurs ont mis au point une méthode consistant à tremper les pétioles des feuilles dans le filtrat de culture du champignon (**Figure 19**), puis à quantifier le degré de flétrissement induit par la toxine comparativement à un témoin traité avec le milieu de culture seul (photo du dispositif sur la **Figure 19-A**). La réponse observée (noircissement des nervures et/ou flétrissement des feuilles) est apparue variable suivant les clones (**Figure 19-B, C et D**). Une corrélation positive entre la sensibilité des clones au champignon (taille des nécroses induite suite au dépôt d'une suspension de spores) et au filtrat de culture (pourcentage de flétrissement) a été observée, sur huit clones d'hévéas.

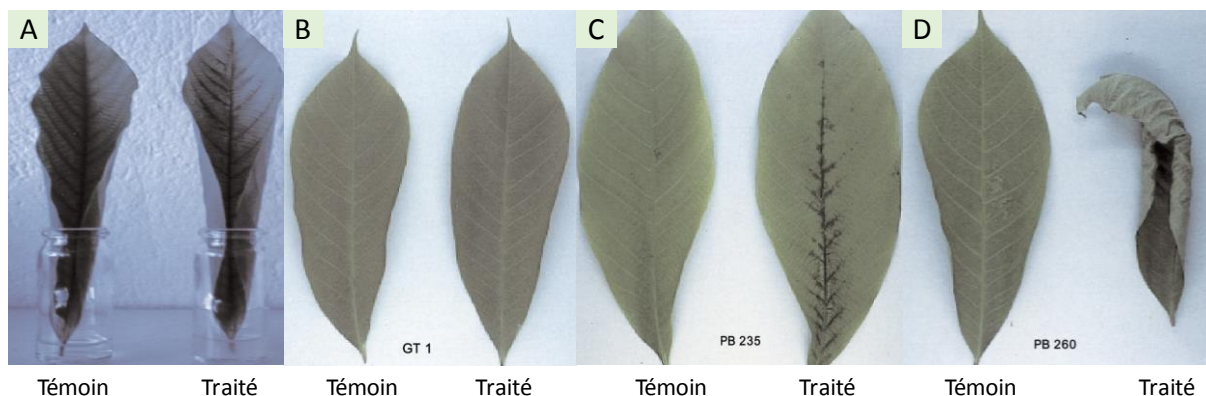


Figure 19 – Effet du filtrat de culture de la souche CCP de *C. cassiicola* sur les feuilles de trois clones d'hévéa de sensibilité variable

A, Les pétioles des feuilles de trois clones d'hévéa de sensibilité variable (GT1, PB235 et PB260) ont été trempés pendant 24h, soit dans du milieu de culture seul (témoin), soit dans du filtrat de culture de la souche CCP (traité).

La feuille traitée du clone résistant GT1 (**B**) ne présente pas de symptômes, celle du clone tolérant PB235 (**C**) présente un noircissement des nervures et celle du clone PB260 (**D**) est entièrement flétrie. Extrait de Breton *et al.* (1997).

Après purification partielle de la toxine, nommée cassiicoline (Breton *et al.*, 2000), une cinquantaine de clones ont été évalués en comparant leur sensibilité à la toxine semi-purifiée (mesurée au moyen du test de flétrissement) et leur sensibilité au champignon (d'après la taille des nécroses induites suite au dépôt d'une suspension de spores) (Figure 20). Cette étude a révélé une forte corrélation positive entre les deux tests ($R^2=0,822$). De plus, l'ajout d'anticorps anti-cassiicoline dans une suspension de spores de CCP inoculée sur les feuilles du clone sensible PB260 a engendré une diminution de la sévérité des symptômes par rapport au témoin inoculé sans anticorps. Tous ces résultats démontrent que la cassiicoline pourrait être un effecteur de virulence important pour la souche CCP.

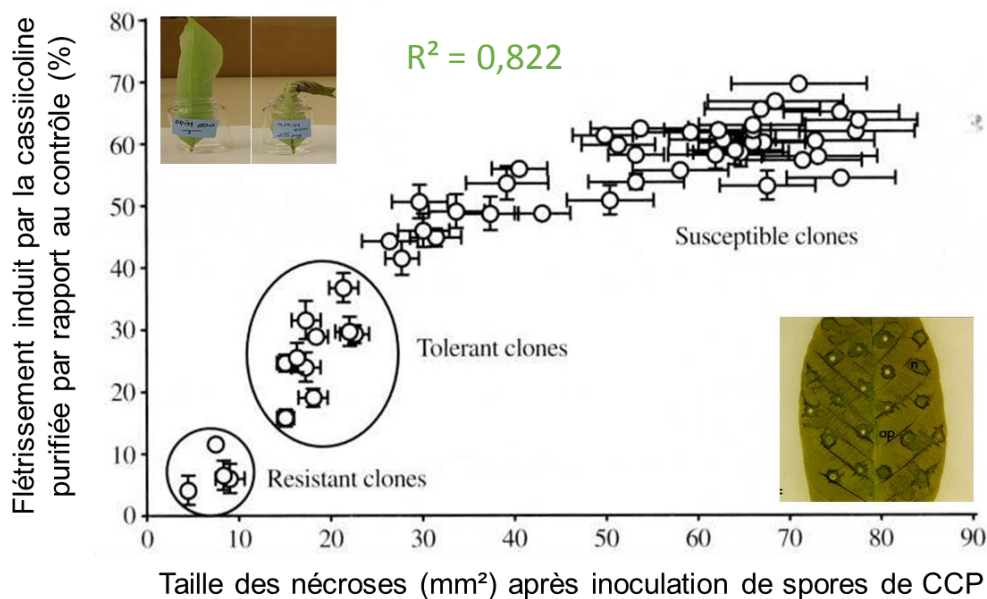


Figure 20 – Corrélation entre la sensibilité des clones d'hévéas à la cassiicoline semi-purifiée et leur sensibilité aux spores de la souche CCP

La toxicité de la cassiicoline a été mesurée à l'aide du test de flétrissement foliaire, consistant à tremper le pétiole des feuilles détachées dans une solution toxique pendant 48h et à mesurer le ratio du poids sec sur le poids frais (mesure des pertes d'eau). L'intensité des symptômes a été estimée 72h après inoculation des spores de CCP en tant que surface de tissu nécrosé (mm²). Chaque point représente un clone d'hévéa.

D'après Breton *et al.* (2000).

La méthode de purification de la cassiicoline a par la suite été perfectionnée et la structure moléculaire de la toxine caractérisée par séquençage et RMN (Barthe *et al.*, 2007; de Lamotte *et al.*, 2007). Il s'agit d'une petite **glycoprotéine** (2884,96 Da) **riche en cystéines**, formée de seulement 27 acides aminés, dont la structure tridimensionnelle est stabilisée par trois ponts disulfures (Figure 21). Elle présente un pyroglutamate à son extrémité N-terminale et un groupement O-méthyl-mannose sur le deuxième acide aminé. A l'heure actuelle, nous ne savons toujours pas si ce sucre joue un rôle dans la toxicité de la molécule.

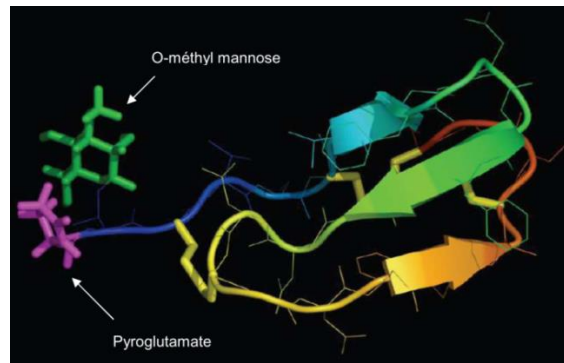


Figure 21 – Structure tridimensionnelle de la cassiicoline, d'après Barthe *et al.* (2007)

La cassiicoline purifiée induit des dommages cellulaires similaires à ceux provoqués par le champignon. Au niveau microscopique (**Figure 22**), les altérations observées sont une plasmolyse des cellules, probablement due à des fuites d'électrolytes engendrées par une modification de la perméabilité membranaire, et une déstructuration des thylakoïdes des chloroplastes. Les profils de sensibilité à la cassiicoline purifiée et à la souche CCP qui la produit sont identiques, que ce soit sur une gamme de clones d'hévéa comme montré dans la **Figure 20** ou sur une collection de différentes espèces végétales, dont le tabac, la tomate, le soja ou encore le peuplier (Barthe *et al.*, 2007). Tous ces travaux suggèrent que la cassiicoline se comporte comme une toxine "hôte sélective" (HST). Son pouvoir pathogène et son niveau d'agressivité dépendent de facteurs de sensibilité propres à chaque hôte ou chaque clone.

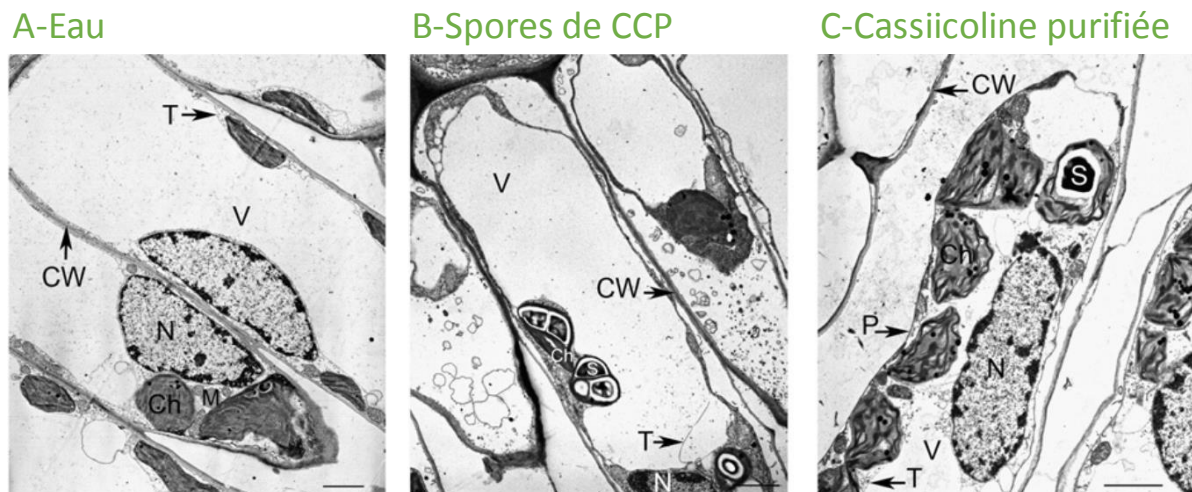


Figure 22 – Effet de la cassiicoline purifiée sur l'ultrastructure cellulaire de l'hévéa

Des folioles du clone PB260 ont été inoculées avec de l'eau (A), des spores de *C. cassiicola* (B) ou avec de la cassiicoline purifiée (C). Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (échelle : 2 µm). On distingue la paroi cellulaire (CW), la membrane plasmatique (P), le tonoplaste (T), les chloroplastes (Ch), la vacuole (V), le noyau (N), les mitochondries (M) et des grains d'amidons (S). Par rapport à une cellule normale (A), les cellules affectées (B et C) ont subi une plasmolyse et une déstructuration des thylakoïdes des chloroplastes.

Extrait de Barthe *et al.* (2007).

Le **gène codant la cassiicoline** de la souche CCP a été cloné et caractérisé (Déon *et al.*, 2012a). Sa taille est de 574 pb et il est composé de trois exons (GenBank EF667973). Il code une préprotéine de 58 acides aminés, organisée en deux domaines : un domaine N-terminal comprenant un peptide signal de 17 acides aminés probablement impliqué dans la sécrétion de la toxine, suivi d'une région de 14 acides aminés (ou linker en anglais), et un domaine C-terminal de 27 acides aminés. Ce dernier est identique à la séquence de la toxine purifiée et correspond donc à la cassiicoline mature. Le gène codant la cassiicoline ne partage aucune homologie de séquence, que ce soit avec les gènes d'autres HSTs ou tout autre gène. Seule sa structure typique permet de le classer dans la catégorie des SSP (Small Secreted Proteins) riches en cystéines, petites protéines impliquées dans les dialogues inter-organismes (effecteurs). Le gène de cassiicoline est exprimé *in vitro* et en interaction avec la plante, avec un pic d'expression 24 h ou 48 h post-inoculation, juste avant l'apparition des premiers symptômes, ce qui suggère un rôle dans les phases précoces de l'infection (Déon *et al.*, 2012a). En 2014, d'autres gènes codant des isoformes différentes de cassiicoline ont été mis en évidence dans d'autres souches (voir partie 2.2.4.2. suivante) et le gène *Cas* de la souche de référence CCP a alors été renommé ***Cas1*** (Déon *et al.* 2014).

2.2.4.2. Diversité des gènes codant la cassiicoline

Une étude portant sur la **détection par PCR et le polymorphisme des gènes codant la cassiicoline** a été menée dans notre équipe sur une partie des souches de *C. cassiicola* utilisées pour l'analyse phylogénétique citée précédemment (Déon *et al.*, 2014 ; **Figure 18**). Il est apparu que seules 47% des souches testées portaient un gène homologue de cassiicoline et parfois deux. **Six isoformes** protéiques distinctes ont ainsi été déduites des séquences nucléotidiques et nommées **Cas1 à Cas6**. Récemment, une **septième isoforme (Cas7)** a été identifiée lors de l'analyse des génomes de 35 souches de *C. cassiicola* (Lopez *et al.*, 2018) choisies d'après la phylogénie de Déon *et al.* (2014). Cette isoforme a été identifiée pour trois souches également porteuses d'un gène de l'isoforme Cas2. Pour toutes les autres souches, les résultats du criblage des gènes *Cas* par PCR ont été confirmés par l'analyse génomique.

L'alignement des sept isoformes potentielles de cassiicoline identifiées à ce jour est présenté en **Figure 23**. Les séquences de ces isoformes ont toutes une structure similaire à Cas1, décrite dans la partie précédente (peptide signal, linker et domaine correspondant à la cassiicoline mature). Cas5 partage 96% d'identité en acides aminés avec la séquence de référence Cas1, avec simplement deux substitutions, une dans le 'linker' et l'autre dans le domaine mature. Les isoformes Cas6 et Cas7 sont les plus divergentes avec seulement 76% d'identité chacune avec Cas1, en raison de douze substitutions (trois dans la partie N-terminale et neuf dans le domaine mature) et de deux insertions (une en N-terminal et une dans le domaine mature) pour Cas6 et onze substitutions (quatre dans la partie N-terminale et sept dans le domaine mature) et quatre

insertions dans le domaine mature pour Cas7. Cas2 est la troisième isoforme la plus divergente, partageant 84% d'identité avec Cas1. Si on ne compare que le domaine de la cassiicoline mature, on s'aperçoit que les isoformes Cas1 à Cas5 apparaissent très similaires entre elles alors que Cas6 est fortement divergente. Par ailleurs, les domaines matures de Cas3, Cas4 et Cas5 sont 100% identiques entre eux. Les isoformes Cas6 et Cas7 ont jusqu'à présent toujours été trouvées dans des souches portant également un gène d'isoforme Cas2.

Cette étude de diversité ciblant les gènes de cassiicoline a permis de classer les souches en 8 classes toxiques : Cas0, Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas2+6 et Cas2+7. Cas0 correspondant aux souches pour lesquelles aucun gène de cassiicoline n'a été détecté. Une **typologie** a ainsi été proposée où chaque type de souche est défini par son **groupe génétique** (sur la base de 4 *loci* concaténés de l'étude phylogénétique) et sa **classe toxique** (sur la base des gènes de cassiicoline). Cette classification a révélé une bonne correspondance entre les clades phylogénétiques et les classes toxiques. En effet, les souches de classe toxique Cas1, Cas2(+6/7), Cas4 et Cas5 appartiennent chacune à un clade unique, respectivement C, A, D et B. Cependant, les souches Cas3 ne sont positionnées dans aucun clade soutenu. Les souches dépourvues de gènes codant la cassiicoline (Cas0) sont réparties dans la plupart des clades.

```

Cas1: MKYLPILISAFVAAVAAAPQDPSAV-APVLPPRQT---CVSCVNFNGFCGDNC-GNSWACSGC
Cas2: MKYLPIFISAFVAAVAAVPQGPSAAAAAILPRQS---CVSCVDFNGFCGDNC-GNSWACSGC
Cas3: MKYLPILISAFVAAITTAAPQDPSAV-APLLPRQS---CVSCVNFNGFCGDNC-GNSWACSGC
Cas4: MKYLPILISAFVAAVTAAPQDPSAV-APLLPRQS---CVSCVNFNGFCGDNC-GNSWACSGC
Cas5: MKYLPILISAFVAAVAAAPQDPSAV-APLLPRQS---CVSCVNFNGFCGDNC-GNSWACSGC
Cas6: MKYFPILISAFVAAVAAAPQGPSAVAAAVLPRQT---CAFCEYFNGYCGNTCTGDSWACSNC
Cas7: MKYLPILISAFVAAVAAAPQNPSSV-AIILPRQSGGPCASCENFNGFCGNTCNGDSWACSSC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1         11        21        31        41        51        61

```

Figure 23 – Séquences protéiques des isoformes Cas1 à Cas7 de la cassiicoline

Les séquences en acide aminé des isoformes Cas1 (Genbank, ABV25895), Cas2 (GenBank, ADC54229), Cas3 (GenBank, JF915169 et JF915170), Cas4 (GenBank, JF915171 et JF915172), Cas5 (GenBank, JF915173, JF915174, JF915175, et JF915179), Cas6 (GenBank, JF915181 et JF915183) et Cas7 (déduite de la séquence nucléotidique enregistrée sur GenBank : MF564202.1) de la cassiicoline ont été alignées à l'aide du logiciel Geneious Pro program v5.3.6. Le domaine mature est indiqué en gras. Le peptide signal est surligné. La séquence entre ces deux régions a été appelé 'linker'. Les substitutions et insertions d'acides aminés, comparativement à la séquence de référence Cas1, sont colorées en gris.

2.2.4.3. Virulence des souches porteuses de l'isoforme Cas1

Dix-huit isolats de *C. cassiicola*, représentatifs des différentes classes toxiques décrites précédemment, ont été testés pour leur virulence sur deux clones d'hévéa de sensibilité contrastée : PB217 et RRIM600 (Déon *et al.*, 2014 ; **Figure 24**). On notera que, dans cette étude, les inoculations ont été réalisées sur des feuilles détachées, avec des temps d'incubation longs (9 jours), ce qui implique que des symptômes de saprotrophie pourraient se superposer aux symptômes de nécrotrophie. Néanmoins, des différences significatives sont apparues entre les souches. Les quatre souches portant le gène codant l'**isoforme Cas1**, dont CCP (1-PH-Hb sur la figure) sont **apparues les plus agressives**, sur les deux clones testés, à l'exception de CCAM3 (4-CA-Hb sur la figure) significativement moins agressive sur le clone tolérant RRIM6000. Les souches des autres classes toxiques sont apparues d'agressivité moyenne, voire faible. Certaines souches Cas0 ont généré des symptômes significatifs (bien que modérés) sur les deux clones, suggérant l'implication d'effecteurs autres que la cassiocoline dans l'apparition des symptômes.

On observe également des différences d'agressivité entre souches de même type, comme dans le cas de CCP et CCAM3, de type C/Cas1 (**Figure 24**). Il avait été montré auparavant (Déon *et al.* 2012a) que les produits du gène *Cas1* de ces deux souches étaient strictement identiques, non seulement dans leur structure primaire mais aussi dans leurs modifications post-traductionnelles (glycosylation avec un méthyl-mannose) : d'une part la séquence nucléotidique du gène *Cas1* était parfaitement identique dans les deux souches, et d'autre part, les toxines purifiées analysées par ESI-QTOF avaient une masse strictement identique dans les deux cas. Les différences d'agressivité observées pourraient être attribuées à une différence de régulation transcriptionnelle du gène *Cas1*. En effet, l'inoculation des souches CCP et CCAM3 sur les feuilles d'un clone d'hévéa sensible (PB260) avait montré que *Cas1* était plus fortement exprimé chez CCP que chez CCAM3, 24h après inoculation (**Figure 25-A**). Ces résultats ont été confirmés sur le clone tolérant RRIM600 48h après inoculation des souches (**Figure 25-B**). Une dernière hypothèse pourrait être que Cas1 ne suffit pas à expliquer la virulence. D'autres effecteurs présents dans CCP mais pas dans CCAM3 pourraient être impliqués.

Ainsi, les différences d'agressivité des souches de *C. cassiicola*, sur un clone sensible donné, peuvent être de nature qualitative (présence/absence ou polymorphisme des effecteurs ; combinaison de plusieurs effecteurs) et/ou quantitative (concentration en effecteurs).

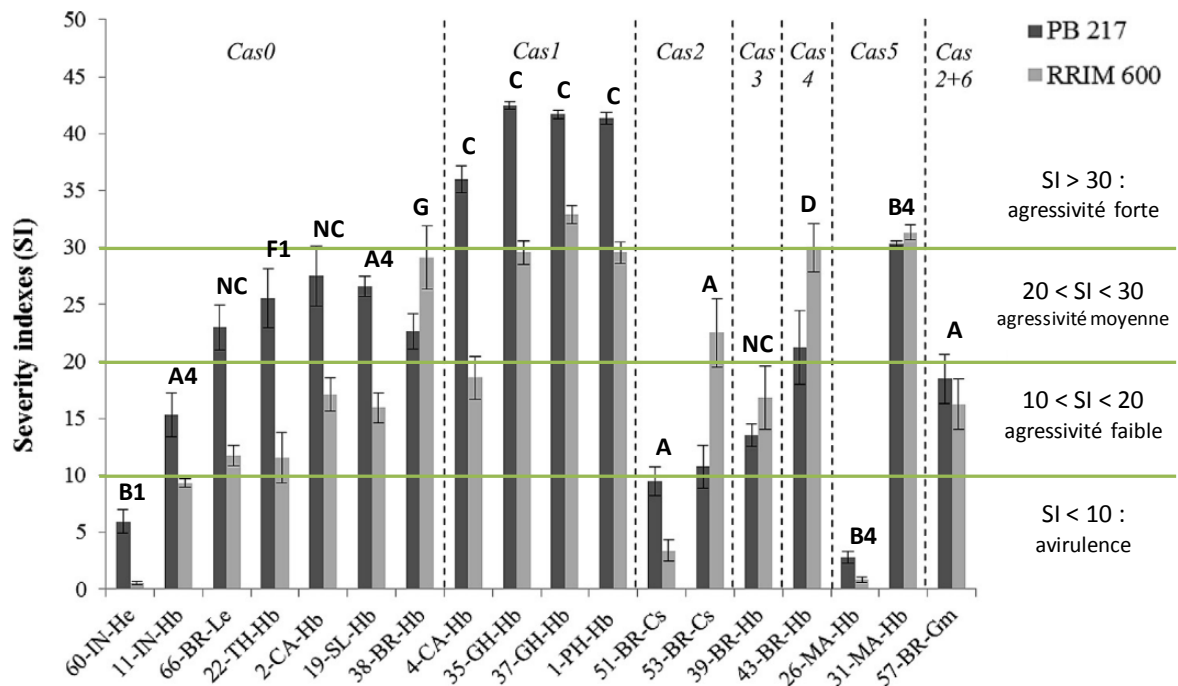


Figure 24 – Virulence de 18 isolats de *C. cassicola* de classe toxinique variée, sur un clone d'hévéa sensible (PB217) et un clone tolérant (RRIM600)

L'indice de sévérité (SI) a été calculé 9 jours après inoculation d'une suspension sporale. La souche 1-PH-Hb correspond à la souche CCP décrite précédemment. Le clade phylogénétique auquel appartient chaque souche a été indiquée au-dessus des histogrammes (NC, non classé). Les différents seuils d'agressivité ont été indiqués par une droite. D'après Déon *et al.* (2014).

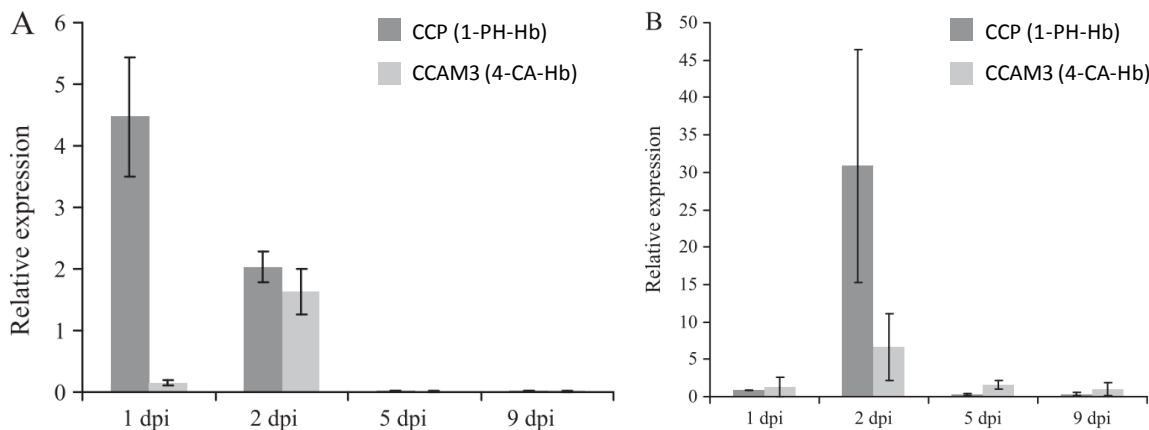


Figure 25 – Analyse de l'expression du gène *Cas1* sur deux souches de *C. cassicola* de type C/Cas1, après inoculation sur feuilles d'hévéas

Des feuilles des clones sensible PB260 (A) et tolérant RRIM600 (B) ont été inoculées avec des spores des souches CCP (1-PH-Hb) ou CCAM3 (4-CA-Hb), puis prélevées 1, 2, 5 et 9 jours après inoculation (dpi pour days post-inoculation). L'expression du gène *Cas1* a été mesurée par qPCR en temps réel. Le gène *EF1α* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm l'erreur standard provenant de deux répliquats indépendants. D'après Déon *et al.* (2012a).

2.2.4.4. Autres effecteurs de *C. cassiicola*

Au vu des résultats précédents, la cassiicoline ne peut pas expliquer à elle toute seule la virulence de toutes les souches de *C. cassiicola*. En effet, certains isolats de type A4/Cas0 (qui ne possèdent pas le gène codant la cassiicoline) génèrent des symptômes modérés mais significatifs sur les clones d'hévéa testés. Il n'est donc pas exclu que d'autres effecteurs que la cassiicoline participent à la virulence de *C. cassiicola*, y compris dans la souche de référence CCP.

Afin d'identifier ces effecteurs, le **génom**e de la souche CCP a été séquencé et assemblé (Lopez *et al.*, 2018). Les prédictions *in silico* ont révélées 2 870 effecteurs putatifs (sur 17 167 protéines prédites), dont 1 411 potentiellement sécrétés. Ces effecteurs putatifs comprennent des CAZymes, des lipases, des peptidases, d'autres protéines sécrétées et des enzymes associées au métabolisme secondaire (**Tableau 4**). Le répertoire en effecteurs putatifs de CCP a ensuite été **comparé** à celui de **44 autres espèces fongiques** séquencées par le DOE-JGI dans le cadre du projet '1000 Fungal Genomes' et représentatives de divers modes de vies (saprophyte, nécrotrophe, biotrophe, hémibiotrophe et ectomycorhizien). *C. cassiicola* apparaît particulièrement riche en effecteurs par rapport aux autres espèces. Une analyse en composante principale (ACP), basée sur le répertoire complet en effecteurs putatifs de ces 45 espèces fongiques, a révélé une proximité de *C. cassiicola* (CCP) avec les champignons *Colletotrichum acutatum* et *Fusarium oxysporum*, et dans une moindre mesure avec *Colletotrichum gloesporioides*, *Nectria hematococca* (téléomorphe de *Fusarium solani*), et *Botrosphaeria dothidea*. La comparaison de la composition en effecteurs de *C. cassiicola* avec ces espèces peut nous donner des informations sur son mode de vie. Comme beaucoup de plantes, *Colletotrichum* est capable par exemple de passer d'un fonctionnement endophyte à un fonctionnement saprophyte quand le matériel végétal entre en sénescence (Promputtha *et al.*, 2010; Promputtha *et al.*, 2007; U'Ren and Arnold, 2016; Porrás-Alfaro and Bayman, 2011; Okane *et al.*, 2008). On peut alors donc se demander si les souches endophytes de *C. cassiicola* (Déon *et al.*, 2012b) ont également ce comportement.

Tableau 4 – Effecteurs putatifs identifiés chez CCP, extrait de Lopez *et al.* (2018)

Catégories d'effecteurs	Effecteurs sécrétés	Effecteurs non sécrétés	Total effecteurs
CAZymes	326	826	1 152
Lipases	40	64	104
Peptidases	124	506	630
Autres protéines sécrétées	921	/	921
Métabolisme secondaire	/	63	63
Total	1 411	1 459	2 870

Puis, pour identifier parmi tous les candidats potentiels de CCP **les effecteurs fonctionnels** qui pourraient être impliqués dans la virulence chez l'hévéa, une **étude transcriptomique** a été conduite sur le clone sensible PB260 inoculé par la souche CCP. Des temps courts ont été choisis pour cette étude (24 et 48h post-inoculation), d'une part pour couvrir les étapes initiales d'infection (germination des spores, pénétration et colonisation du mycélium), d'autre part car il a été montré que l'apparition des symptômes étaient précédés d'une activation transitoire du gène *Cas1* dès 24h après inoculation (Déon *et al.*, 2012a). Les spores en germination de CCP ont été utilisées comme référence de l'analyse différentielle des gènes. Sur les 17 147 transcrits de CCP, 14 980 (87%) étaient exprimés dans ces spores en germination dont 353 différentiellement exprimés (majoritairement sur-exprimés) durant les étapes précoces d'infection de la plante. Parmi ces gènes différentiels, 92 (dont la cassiicoline *Cas1*) sont des effecteurs potentiels, soit environ 3% de l'ensemble des effecteurs théoriques (**Tableau 5**).

Tableau 5 – Résultats de l'analyse transcriptomique de l'interaction compatible entre CCP et le clone d'hévéa sensible PB260, extrait de Lopez *et al.* (2018)

Transcriptome de CCP 17 167 gènes					
Gènes exprimés dans les spores en germination 14 980 (87%)			Gènes non exprimés dans les spores en germination 2 179 (13%)		
Gènes diff.* 353 (2%)		Gènes non diff.* 14 635 (85%)		Gènes non diff.* 2 179 (13%)	
Effecteurs 92 (0,5%) dont Cas1 et 7 autres SSP	Autres 261 (1,5%)	Effecteurs 2 397 (14%)	Autres 12 238 (71,3%)	Effecteurs 381 (2,2%)	Autres 1 798 (10,5%)

*diff. : différentiellement exprimés lors d'une interaction compatible avec l'hévéa (clone PB260).

Enfin, les **génomés de 35 souches de *C. cassiicola*** présents dans la phylogénie de Déon *et al.* (2014 ; **Figure 18**) ont été séquencés afin de rechercher des **homologues des effecteurs putatifs de CCP** (Lopez *et al.*, 2018). La plupart des souches ont été prélevées sur hévéa (74%) mais également chez d'autres plantes hôtes : *Cucumis sativus* (47-BR-Cs, 50-BR-Cs, 51-BR-Cs, 52-BR-Cs, 53-BR-Cs et 54-BR-Cs), *Glycine max* (56-BR-Gm, 57-BR-Gm), *Piper hispidinervum* (69-BR-Ph) et *Vernonia cinerea* (70-BR-Vc). Toutes les souches ont été collectées à partir de feuilles présentant des nécroses, à l'exception de trois souches (38-BR-Hb, 41-BR-Hb et 43-BR-Hb) provenant de feuilles d'hévéa asymptomatiques du Brésil.

Parmi les 2 870 gènes codant les effecteurs putatifs de CCP, 2 258 (78,6%) ont été retrouvés en une seule copie dans chaque souche et ont été considérés comme des effecteurs "cœur" (core effectors). Les 612 gènes restants, absents ou présents en plusieurs copies dans au moins un isolat (le gène codant la cassiicoline par exemple), étaient considérés comme des effecteurs "accessoires" (**Tableau 6**). Ces effecteurs "accessoires" ont été trouvés dans toutes les catégories fonctionnelles dont 24 associés au métabolisme secondaire, 195 CAZymes, 24 lipases, 135 peptidases et 234 autres protéines sécrétées (LSPs et SSPs).

Tableau 6 – Effecteurs putatifs "cœur" et "accessoires" identifiés parmi 36 isolats de *C. cassiicola*, extrait de Lopez et al. (2018)

Catégorie d'effecteurs	Effecteurs CCP totaux			Effecteurs accessoires		
	Total	Sécrété	Non sécrété	Total	Sécrété	Non Sécrété
				Nbr (% de CCP)	Nbr (% de CCP)	Nbr (% de CCP)
Métabolisme secondaire	63		63	24 (38,1)		24 (38,1)
CAZymes	1 152	326	826	195 (16,9)	45 (13,8)	150 (18,2)
Lipases	104	40	64	24 (3,9)	5 (12,5)	19 (29,7)
Peptidases	630	124	506	135 (22,1)	23 (18,5)	112 (22,1)
Autres LSPs	411	411		108 (26,3)	108 (26,3)	
Autres SSPs	510	510		126 (24,7)	126 (24,7)	
Total	2 870	1 411	1459	612 (21,3)	307 (21,8)	305 (20,9)

Les effecteurs "accessoires" sont des effecteurs absents ou dont le nombre de copies varie dans au moins un isolat, par opposition aux effecteurs "cœur", trouvés en au moins une copie dans chacun des 36 isolats. Seule la sécrétion conventionnelle dépendante du complexe réticulum endoplasmique/appareil de Golgi a été considérée ; LSP (Large Secreted Proteins > 300 acides aminés), SSP (Small Secreted Proteins < 300 acides aminés).

2.3. Les méthodes de sélection pour la sensibilité/tolérance à *C. cassiicola*

L'épidémie dévastatrice touchant le clone RRIC103, apparue initialement au Sri Lanka durant l'année 1985, a révélé le danger de la maladie CLF. Elle a par la suite affecté des milliers d'hectares de ce clone à travers le monde, conduisant à de lourdes pertes économiques et à la nécessité d'arracher ce clone (Jayasinghe, 1997; Liyanage *et al.*, 1986). Dès lors, les pays hévécologues ont pris conscience de l'urgence qu'il y avait à créer et développer des clones d'hévéa plus tolérants à la CLF. Plusieurs **méthodes de sélection** envisageables sont décrites ci-dessous, avec leurs **avantages** et leurs **limites**.

2.3.1. Observations des symptômes en plantations

Cette méthode présente l'avantage de prendre en compte l'environnement de la plante (climat, sol, interaction avec d'autres microorganismes...) et donc d'être **proche des réalités du terrain**. Cependant, cette méthode peut être très **longue** car dépendante des épidémies, qui peuvent ne pas se manifester pendant plusieurs années. De plus, il est très facile de **confondre** les symptômes foliaires causés par *C. cassiicola* avec d'autres maladies telles que l'anthracnose (*Colletotrichum* Leaf Spot), surtout sur jeunes feuilles. Cette méthode dépend donc beaucoup de l'observateur et nécessite une **expertise qualifiée** et des méthodes de diagnostic fiables. Enfin, la sélection par cette méthode ne peut porter que sur l'inoculum local et ne présage pas du comportement des arbres en cas d'introduction de nouvelles souches virulentes.

2.3.2. Inoculation en conditions contrôlées

L'inoculation contrôlée avec des souches isolées a l'avantage de ne pas être **tributaire des épidémies naturelles** et permet de prendre en compte la grande diversité des souches. En effet, l'inoculation est pratiquée en laboratoire en conditions stériles, sur feuilles détachées, ce qui permet de tester sans risque une gamme de souches de différentes provenances géographiques, à condition de travailler en milieu confiné. Dans la pratique, dans le cadre du projet IFC-Corynespora, les inoculations sont pratiquées en France, à partir de plans d'hévéa maintenus en serre, pour éviter tout risque de contamination pour les plantations. Cette méthode est **lourde à mettre en œuvre** et le **coût** d'entretien du matériel en serre est élevé. De plus, l'environnement (température et humidité) est optimal pour le champignon mais ne reflète pas forcément les conditions des plantations, plus variables. L'inoculation sur feuilles non détachées se rapproche plus des conditions réelles mais est encore plus lourde à mettre en œuvre.

2.3.3. Sélection assistée par les effecteurs fongiques

Cette méthode indirecte consiste à **tester la sensibilité/tolérance des plantes aux effecteurs sécrétés par le champignon** plutôt qu'au champignon lui-même. Le fait d'utiliser un effecteur sous forme purifiée (ou sous la forme d'un filtrat de culture stérile) plutôt que le champignon lui-même élimine tout risque de contamination et peut donc être pratiqué en milieu non confiné. Le séquençage d'un nombre croissant de génomes de pathogènes a permis d'accélérer le développement de cette stratégie dans de nombreux patho-systèmes : les gènes d'effecteurs candidats sont identifiés *in silico* et clonés dans des vecteurs d'expression. Ils peuvent ensuite être introduits et exprimés transitoirement dans les cellules végétales par l'intermédiaire d'*Agrobacterium* (Kapila *et al.*, 1997) ou de **systèmes viraux** (Kanneganti *et al.*, 2007). Ils peuvent aussi être exprimés dans des bactéries ou des levures cultivées *in vitro* ; c'est alors le filtrat de culture qui est introduit dans les tissus de la plante. Chez certaines plantes, en particulier certaines céréales, les solutions contenant les effecteurs peuvent être infiltrées dans les tissus foliaires à l'aide d'une **seringue sans aiguille**. Ces stratégies ont été pratiquées avec succès pour caractériser la réponse aux effecteurs ToxA, SnTox1 et SnTox3 de *Pyrenophora tritici-repentis* chez le blé (Oliver *et al.*, 2014), ou encore à l'effecteur PttNE1 de *Pyrenophora teres f. teres* chez l'orge (Liu *et al.*, 2015). La technique d'agro-infiltration (infiltration d'agrobactéries) a été utilisée pour identifier les effecteurs protéiques de *Heterobasidion annosum*, pathogène nécrotrophe des conifères (Raffaello and Asiegbu, 2017). Les auteurs ont pu mettre en évidence que 8 des 58 effecteurs protéiques de type SSP (HaSSPs) identifiés dans le génome de *H. annosum* étaient capables d'induire des chloroses et la mort cellulaire lors d'une expression transitoire chez le tabac.

Chez l'hévéa, la structure des tissus foliaires ne permet pas leur infiltration à la seringue. D'autres méthodes ont été développées pour introduire les effecteurs potentiels (cassiicoline purifiée ou filtrats de culture fongiques) dans les tissus de la feuille : en trempant l'extrémité du pétiole dans la solution toxinique (test du flétrissement décrit précédemment) ou en déposant des gouttes de solution toxinique sur la face inférieure des feuilles, après grattage superficiel de l'épiderme (Breton *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2016). Dans le premier cas, l'intensité des symptômes est exprimée par le pourcentage des pertes en eau induites par le traitement toxinique. Dans le deuxième cas, on mesure les fuites d'électrolytes consécutives aux dégâts cellulaires (perméabilité membranaire) engendrés par les toxines, en particulier la cassiicoline (Barthe *et al.*, 2007).

Le **test toxinique par conductimétrie**, testé initialement sur plants en serre (thèse Marine Déon, 2012), a ensuite été évalué sur deux plantations en Côte d'Ivoire (Tran *et al.*, 2016), sur une large gamme de clones en réponse à la cassiicoline purifiée Cas1 ou aux filtrats de différents types de souches. Les réponses mesurées en réponse à la cassiicoline Cas1 purifiée sont apparues

quantitatives (proportionnelles à la concentration en toxine appliquée), reproductibles, et ont permis une bonne discrimination des clones. En réponse aux filtrats de culture cependant, la répétabilité des mesures est moins bonne, probablement influencée par l'état sanitaire des feuilles et par la variabilité de la composition en effecteurs des filtrats d'un lot à un autre. Mais la principale interrogation concerne le caractère prédictif du test. Une bonne corrélation a été observée entre la sensibilité au filtrat de culture (test toxinique) et la sensibilité en inoculation contrôlée, mesurées sur huit clones en serre en réponse à deux souches (CCP et CCI13, respectivement de type C/Cas1 et A/Cas0) (Tran *et al.*, 2016). Cependant, quelques incohérences ont été constatées entre les résultats du test et le comportement de certains clones en plantation. Le clone IRCA18 par exemple a été montré tolérant à tous filtrats de culture testés (sauf CCP) alors qu'il est considéré comme très sensible à *C. cassiicola* (thèse de Tran Dinh Minh, 2016).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces incohérences :

- L'inoculum en plantation présente potentiellement une diversité importante et le diagnostic visuel est parfois compliqué. Les niveaux d'attaque observés en plantation sont-ils le résultat de la seule action de *C. cassiicola* ou pourraient-ils être dus à l'action combinée de plusieurs pathogènes ?
- Les souches utilisées pour le test toxinique n'étaient peut-être pas représentatives du type de souches de *C. cassiicola* rencontrées en plantations en Afrique de l'Ouest.
- L'utilisation de filtrats de culture, contenant potentiellement un mélange complexe d'effecteurs, multiplie les possibilités d'interaction. Il serait préférable de tester uniquement des effecteurs isolés mais actuellement, seule la cassiicoline Cas1 est disponible, sous forme purifiée.

Le test toxinique par conductimétrie a aussi été appliqué sur une descendance issue du croisement entre le clone sensible PB260 et le clone tolérant RRIM600 (Tran *et al.*, 2016). Cette analyse a permis d'identifier deux QTL associés à la cassiicoline purifiée (isoforme Cas1). Ce résultat ouvre une voie prometteuse pour la sélection assistée par marqueurs de clones insensibles à la cassiicoline, donc potentiellement à toutes les souches de *C. cassiicola* produisant cet effecteur.

OBJECTIFS DE THÈSE

Comme nous avons pu le voir dans cette synthèse bibliographique, la lutte contre la maladie CLF représente un enjeu économique majeur pour les planteurs d'hévéas en Asie et en Afrique. Les méthodes classiques de lutte contre les pathogènes fongiques (fongicides, défoliation artificielle) étant insuffisantes pour éviter le développement de la maladie, mais aussi coûteuses et néfastes pour l'environnement, la sélection de variétés tolérantes/résistantes à *Corynespora cassiicola* apparaît donc indispensable pour l'hévéaculture. C'est tout l'enjeu du **projet IFC-Corynespora** qui a pour objectif de **développer des méthodes de prédiction de la sensibilité des clones d'hévéa à la maladie CLF**, basées sur notre connaissance du champignon et de ses effecteurs.

L'identification précoce des clones les plus à risque permettrait de les éliminer des plantations et ainsi de réduire la pression en inoculum pathogène. En effet, l'amplification d'un inoculum hautement virulent par un clone très sensible planté sur de grandes surfaces peut augmenter le risque de propagation épidémique de la maladie à des clones auparavant tolérants ou peu sensibles, avec des conséquences économiques considérables pour les planteurs. Une bonne gestion du risque nécessite donc de bien connaître la sensibilité du matériel planté pour gérer les surfaces plantées avec le meilleur compromis entre productivité et tolérance aux maladies. Par ailleurs, une méthode d'évaluation précoce de la sensibilité à la CLF permettrait d'accélérer le processus de sélection dans les programmes de création variétale. Mais comme nous l'avons vu précédemment, les méthodes de sélections disponibles présentent toutes des avantages et des inconvénients, nécessitant de trouver des compromis entre le coût d'une évaluation en conditions réelles, longue et aléatoire, et le risque d'écarter des clones à haut potentiel de production sur la base de tests de sensibilité indirects peut-être trop drastiques.

Une **sélection basée sur la sensibilité à la cassiicoline** pourrait être une voie prometteuse, à condition qu'elle joue un rôle déterminant dans la virulence chez l'hévéa. La cassiicoline présente plusieurs caractéristiques rencontrées chez d'autres effecteurs : c'est une petite protéine sécrétée par le champignon, dont le gène est activé transitoirement lors des phases précoces de l'infection chez l'hévéa ; sous forme purifiée, elle induit une toxicité sélective sur certaines plantes hôtes et certains clones d'hévéa seulement, avec des profils de réponse comparables à ceux obtenus en inoculation contrôlée avec la souche dont elle issue.

Le test toxinique par conductimétrie, relativement simple à mettre en œuvre et sans risque pour les plantations, pourrait être utilisé à grande échelle dans le cadre de programmes de création variétale actuellement en cours en Afrique de l'Ouest, pour évaluer la sensibilité à la CLF. Cependant, des interrogations persistent concernant le caractère prédictif de cette approche et nécessitent un certain nombre de vérifications préalables.

Ma thèse, consacrée à la **cassiicoline Cas1**, seul effecteur purifié et caractérisé à ce jour, a pour objectif de répondre aux questions suivantes :

Question 1 : La sensibilité à la cassiicoline Cas1 est-elle un critère de sélection pertinent pour éliminer les clones d'hévéa les plus sensibles à la maladie CLF ?

Cette question peut se décomposer en plusieurs points :

(i) Le diagnostic de la maladie CLF réalisé par observations visuelles est-il suffisamment fiable ? Sur jeunes feuilles, il est souvent difficile de différencier les symptômes dus à *C. cassiicola* de ceux causés par d'autres pathogènes fongiques. Cette vérification préliminaire est importante afin d'évaluer sans erreur d'interprétation la prédictibilité de l'approche "sélection assistée par effecteur", la cassiicoline étant strictement spécifique de *C. cassiicola*.

(ii) Quelle est la prévalence des souches porteuses de la cassiicoline Cas1 dans l'inoculum naturel des plantations d'Afrique de l'Ouest ? La souche CCP dont est issue la cassiicoline est originaire des Philippines. Si les souches porteuses de Cas1 sont peu (ou pas) présentes sur les plantations africaines, il serait inapproprié d'écarter des clones sensibles à Cas1 mais par ailleurs très prometteurs en termes de production et qui ne seraient peut-être jamais malades dans le contexte africain.

(iii) La cassiicoline Cas1 explique-t-elle à elle seule la virulence de la souche qui la sécrète ? Si d'autres effecteurs sont impliqués et que la part de la cassiicoline dans la virulence est comparativement faible, une sélection basée uniquement sur la sensibilité à la cassiicoline ne serait pas pertinente.

Question 2 : Quels sont les facteurs de sensibilité à la cassiicoline Cas1 chez l'hévéa ?

La réponse de sensibilité à la cassiicoline étant spécifiquement clonale, l'identification des facteurs moléculaires déterminants pour cette réponse de sensibilité permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action de la cassiicoline et les moyens mis en œuvre par la plante pour se défendre.

Cette question peut être déclinée en deux points :

(iv) Quelle est la ou les cible(s) moléculaire(s) interagissant physiquement avec la cassiicoline Cas1 chez un clone d'hévéa sensible ?

(v) Quelles sont les gènes dont l'expression est modifiée par l'application de la cassiicoline Cas1 purifiée chez un clone sensible et chez un clone tolérant ?

Mes travaux de thèse seront présentés en trois chapitres distincts, comportant chacun un rappel des objectifs, une partie "Matériel et Méthodes", la description des résultats et une discussion.

CHAPITRE 1 : Etude de l'inoculum naturel fongique des feuilles d'hévéa en Afrique de l'Ouest

Ce premier chapitre de thèse concerne les points (i) et (ii) de la question 1 posée précédemment. L'objectif est de tout d'abord de confirmer le rôle de l'espèce *C. cassiicola* dans l'apparition des symptômes attribués à la CLF en Afrique de l'Ouest, puis d'étudier la proportion des souches porteuses du gène *Cas1* par rapport à l'ensemble des souches de *C. cassiicola* présentes sur les plantations d'hévéas africaines. Pour cela, une étude de l'inoculum naturel fongique présent en Afrique de l'Ouest a été menée à partir de feuilles d'hévéas malades provenant des plantations partenaires de l'IFC. Elle s'est échelonnée tout au long des trois années de thèse, en fonction des attaques observées.

CHAPITRE 2 : Etude d'un mutant de délétion du gène *Cas1*

Ce deuxième chapitre de thèse apportera des réponses concernant le point (iii) de la première question posée dans ce mémoire. Pour déterminer l'importance de la cassiicoline *Cas1* pour la virulence de la souche de référence CCP, comparativement à d'autres effecteurs potentiels, un mutant de délétion du gène *Cas1* a été créé à partir de la souche CCP. Les deux souches (native et mutée) ont ensuite été comparées sur des critères de croissance du mycélium, production et germination des spores *in vitro*, virulence du champignon et toxicité des filtrats de culture sur feuilles d'hévéa.

CHAPITRE 3 : Identification chez l'hévéa de facteurs de sensibilité à la cassiicoline *Cas1*

Ce troisième et dernier chapitre de thèse permettra de répondre à la deuxième question posée précédemment, à savoir d'identifier les acteurs moléculaires mis en place lors de l'interaction entre la cassiicoline *Cas1* et l'hévéa. Pour cela, deux approches différentes mais complémentaires ont été entreprises. Tout d'abord, (iv) des interacteurs potentiels de *Cas1* ont été recherchés à l'aide d'une technique d'interaction protéine-protéine : le double hybride en levure. Puis, (v) une analyse transcriptomique nous a permis d'identifier les gènes d'hévéa dont l'expression est modifiée suite à l'application de la cassiicoline purifiée sur feuilles d'hévéa, en comparant un clone sensible (PB260) et un clone tolérant (RRIM600). A plus long terme, l'objectif serait de proposer un test de génotypage de la sensibilité des clones d'hévéa à *C. cassiicola*, complémentaire des tests de phénotypage (test toxinique, inoculation contrôlée ou observation de la sensibilité au champ).

Pour terminer, une conclusion générale reliant les trois chapitres et les perspectives envisagées viendront clore ce mémoire.

CHAPITRE 1

**Etude de l'inoculum naturel
fongique des feuilles d'hévéa
en Afrique de l'Ouest**

1. Contexte d'étude et objectifs

La **maladie** 'Corynespora Leaf Fall' (**CLF**), provoquée par le champignon *Corynespora cassiicola*, est devenu une préoccupation majeure pour les planteurs d'hévéa. Les clones les plus sensibles subissent des défoliations épidémiques au moment de la refoliation naturelle (ou parfois plus tard au cours de la saison des pluies), ce qui a pour conséquence d'affecter presque immédiatement le rendement en latex des parcelles touchées et de favoriser le renouvellement des attaques d'une année sur l'autre et l'extension à d'autres clones. Les premiers symptômes foliaires sont l'apparition de taches nécrotiques entourées d'un halo jaune plus ou moins marqué. Les jeunes feuilles, très sensibles, tombent. Les feuilles peuvent résister à la **défoliation** si l'attaque se produit à un stade phénologique plus avancé, mais elles restent très abîmées, avec souvent un noircissement typique des nervures autour du point de nécrose, symptôme caractéristique dit en "arête de poisson".

Lors d'une épidémie, le diagnostic visuel réalisé par les hévéaculteurs directement sur la plantation permet dans certains cas de déterminer la cause de la maladie. Cependant, les **symptômes** de la maladie CLF peuvent parfois être **confondus** avec ceux provoqués par d'autres pathogènes fongiques, notamment aux stades foliaires juvéniles. Ainsi, depuis 2012, nous recevons régulièrement des feuilles d'hévéa malades provenant de Côte d'Ivoire, du Libéria, du Ghana et du Nigéria, dans le but de confirmer le diagnostic visuel réalisé sur l'arbre et d'identifier avec précision l'agent fongique responsable des symptômes observés. Ponctuellement, des feuilles saines d'hévéa ont été analysées afin d'isoler d'éventuelles souches **endophytes** de *C. cassiicola*. Par ailleurs, nous avons aussi analysé quelques feuilles de papaye et de manioc (cultures villageoises présentes dans ou à proximité des parcelles) ou encore du pueraria (légumineuse semée en culture intercalaire pour amender les sols) ; ceci afin de vérifier si ces plantes constituent des **réservoirs** potentiels de souches de *C. cassiicola*.

Des études antérieures réalisées par notre laboratoire et d'autres équipes ont révélé l'importante diversité génétique de l'espèce *C. cassiicola*. La typologie que nous avons adoptée, décrite dans la Synthèse Bibliographique (paragraphe 2.2.3 et 2.2.4.2), identifie le clade phylogénétique par une lettre (de A à H, d'après l'étude de Déon *et al.*, 2014), suivi par l'indication de la classe toxinique sur la base du gène de cassiicoline. Dans une étude portant sur 18 souches de types variés, les souches de type C/Cas1 (porteuses du gène de référence *Cas1*) se sont révélées être les plus agressives en inoculation sur deux clones de sensibilité contrastée (**Figure 24**, Déon *et al.*, 2014).

L'**objectif global** de ce premier chapitre de thèse est de caractériser l'inoculum fongique associé aux nécroses foliaires chez l'hévéa, pour confirmer (ou non) l'implication de *C. cassiicola* dans l'apparition des symptômes attribués à la CLF, et préciser le type de souches incriminées.

Nous décrirons tout d'abord la diversité des espèces fongiques obtenues par isolement mycélien à partir de feuilles provenant de différentes plantations africaines, de 2012 à 2017. Puis, nous présenterons les premiers résultats d'une analyse de diagnostic moléculaire par qPCR ciblant les maladies CLF et anthracnose. Enfin, nous finirons par décrire la diversité typologique des souches de *C. cassiicola* issues des isollements mycéliens, afin d'estimer la prévalence des souches porteuses du gène *Cas1*, réputées plus virulentes, dans l'inoculum naturel des plantations en Afrique de l'Ouest.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

Des souches fongiques ont été récupérées par la méthode d'isolement mycélien à partir de feuilles d'hévéa, de manioc, de papaye et de pueraria, collectées sur différentes plantations situées en Côte d'Ivoire, Libéria, Ghana et Nigéria, de 2012 à 2017. Les informations concernant la date de prélèvement (mois et année), le pays, la plantation et la parcelle d'origine, la plante, le clone d'hévéa, l'état des feuilles (malades ou saines), le nombre de feuilles et le nombre d'isolement par prélèvement sont présentées en **Annexe 2**. Une partie des feuilles d'hévéa prélevées en Côte d'Ivoire en mars et en novembre 2017 a été utilisée pour la mise au point du diagnostic moléculaire par qPCR (en bleu dans le tableau en **Annexe 2**). Les feuilles ont été envoyées soit fraîches directement après la récolte (pour les isollements mycéliens), soit après séchage une nuit à 50°C dans un incubateur (pour le diagnostic moléculaire par qPCR). En moyenne, il faut compter cinq jours entre le prélèvement et la réception des feuilles au laboratoire pour analyse. Les feuilles fraîches ont été traitées dès leur réception alors que les feuilles sèches ont été lyophilisées pendant trois jours puis stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.2. Isolement mycélien et caractérisation moléculaire des souches

Pour isoler les champignons associés aux nécroses foliaires, des feuilles fraîches (hévéa, manioc, papaye ou pueraria ; **Annexe 2**), ont été stérilisées en surface sous une hotte à flux laminaire par immersion dans plusieurs bains successifs : éthanol 70% (30 sec), solution d'hypochlorite de sodium 2% (2 min), éthanol 70% (30 sec) et eau stérile (1 min). Des fragments foliaires (3 mm²), présentant ou non des nécroses, ont été découpés et déposés sur du milieu MEA (Malt Extract Agar, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) additionné d'acide lactique 0,02%. Pour chaque

feuille prélevée, au moins trois isollements mycéliens ont été réalisés. Après 24h d'incubation à 26°C dans le noir, le mycélium émergeant des segments foliaires a été repiqué sur du milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, Detroit, MI, USA) additionné d'acide lactique 0,02% et incubé dans les mêmes conditions. Plusieurs repiquages successifs ont été nécessaires pour avoir un mycélium homogène en termes de croissance, de couleur et de morphologie.

L'identité des souches a été confirmée par séquençage d'amplicons correspondant aux régions ITS (Internal Transcribed Spacer) des gènes codant les ARN ribosomiques. Pour chaque isolat fongique, le mycélium âgé d'une semaine a été collecté, congelé et broyé à l'azote liquide. L'ADN génomique (ADNg) a été extrait selon le protocole décrit par Risterucci *et al.* (2000). Les régions ITS1, 5.8S et ITS2 de l'ARN ribosomique ont été amplifiées à partir de 100 ng d'ADNg fongique dans un mélange réactionnel contenant 0.2 µM des amorces ITS1 et ITS4 (White *et al.*, 1990 ; **Annexe 3**), 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 X de tampon GoTaq flexi Buffer et 1,25 U de GoTaq polymérase (Promega, Madison, WI, USA). L'amplification a été conduite sur 35 cycles selon les conditions suivantes : 2 min à 95°C, 30 sec à 56°C et 5 min à 72°C. Pour déterminer le genre auquel appartient chaque souche, les amplicons ITS ont été séquençés par GATC-Biotech (Konstanz, Allemagne) et leurs séquences ont été comparées avec la banque de données NCBI en utilisant le programme blastn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Dans le but d'avoir un mycélium génétiquement homogène, un isolement monospore a été systématiquement réalisé sur les souches fongiques identifiées comme appartenant au genre *Corynespora*. Le prélèvement, l'extraction d'ADNg, l'amplification PCR et le séquençage ont été réalisés selon la même procédure que précédemment. Néanmoins, l'amplification des loci *ga4*, *caa5* et *act1* et des différents gènes codant la cassiicoline (Cas1 à Cas7) a été ajoutée à celle des régions ITS (amorces en **Annexe 3**). Toutes ces séquences seront utilisées dans une analyse phylogénétique décrite ultérieurement afin d'établir la typologie des souches de *C. cassiicola* (Dixon *et al.*, 2009; Déon *et al.*, 2014).

2.3. Diagnostic moléculaire par qPCR

Des feuilles séchées d'hévéa, décrites en **Annexe 2** (en bleu dans le tableau), ont été utilisées afin de mettre au point un test de détection des champignons appartenant à l'espèce *C. cassiicola* et au genre *Colletotrichum*, ne nécessitant pas d'isolement mycélien. Deux méthodes de prélèvements des feuilles ont été testées (**Figure 26**) : soit la totalité de la feuille a été prélevée après un découpage en plusieurs morceaux (**Figure 26-A**), soit les parties nécrosées et les parties "vertes" (ou "saines") d'une même feuille ont été découpées à l'aide d'un emporte-pièce et prélevées séparément (**Figure 26-B**). Tous les échantillons ont été broyés à température ambiante à l'aide

d'un broyeur à billes (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'ADNg a été extrait selon le protocole décrit par Risterucci *et al.* (2000).

Quatre couples d'amorces ont été utilisés pour ce test (**Annexe 3**). Les amorces Caa5-F4 et Caa5-R4 ont servi à détecter des souches de *C. cassiicola*. Elles amplifient un fragment d'ADN d'environ 75 pb situé sur le locus *caa5* servant initialement à établir la phylogénie des souches (Dixon *et al.*, 2009; Déon *et al.*, 2014). Pour *Colletotrichum*, trois complexes d'espèces ont été identifiés à partir de l'alignement de 110 séquences ITS obtenues lors des différents isolements mycéliens. Les couples d'amorces qGLOE-F1/R1, qCOL SPE-F2/R2 et qCOL SPE-F3/R3 ont chacun permis d'amplifier un fragment d'ADN d'environ 100 pb situé au niveau des régions ITS des différents complexes d'espèces, appelés groupe 1 (Gr1), groupe 2 (Gr2) et groupe 3 (Gr3), respectivement. Les amorces qGLOE-F1 et qGLOE-R1 ont été extraites de Garrido *et al.* (2009) alors que les autres ont été dessinées manuellement à l'aide du logiciel Geneious Pro v10.2.3.

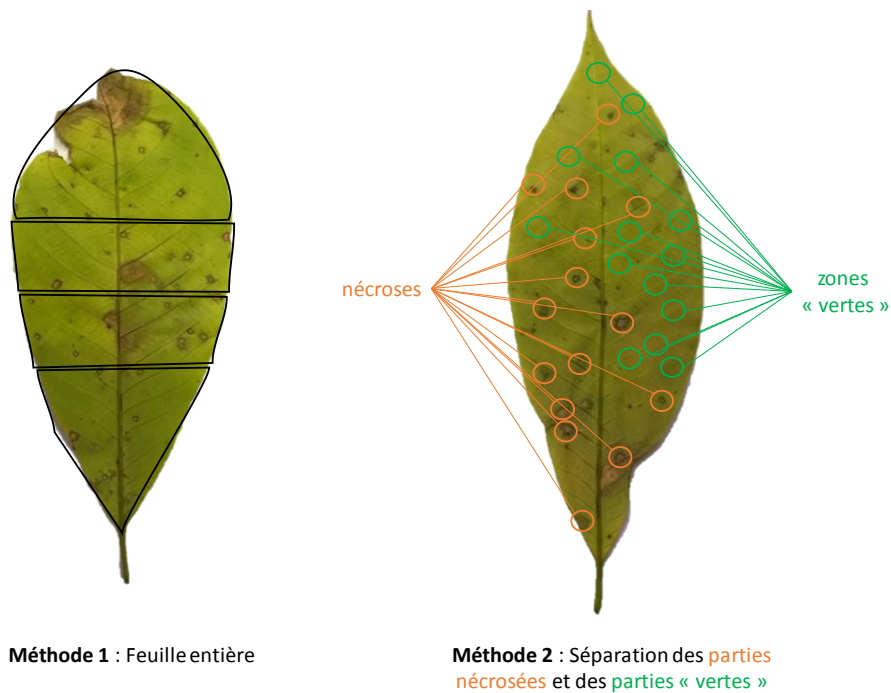


Figure 26 – Méthodes de prélèvement des feuilles utilisées pour la mise au point du diagnostic moléculaire par qPCR.

Méthode 1 : la feuille entière a été découpée en plusieurs morceaux avant d'être broyée.

Méthode 2 : toutes les parties nécrosées et les parties "vertes" d'une même feuille ont été découpées avant d'être broyées séparément.

Afin de quantifier l'ADNg des souches de champignons d'intérêt, présent dans les feuilles d'hévéa, la méthode de PCR quantitative absolue a été utilisée. Cette méthode s'appuie sur la construction d'une droite d'étalonnage standard qui relie les valeurs de Ct (en ordonnée) à des quantités connues d'ADNg (en abscisse). Une droite standard est créée à partir d'une gamme de dilution d'ADNg fongique calibrée à 5 ng/ μ l puis diluée cinq fois au 1/5. Une gamme de dilution a été réalisée pour *C. cassiicola* (souche CCP) et pour les trois complexes d'espèces du genre

Colletotrichum (une souche par groupe). Les échantillons foliaires ont été calibrés à 100 ng/μl. Les réactions d'amplification ont été effectuées à l'aide du thermocycleur StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) à partir de 2 μl d'ADNg (échantillons foliaires ou gammes de dilution), dans un mélange réactionnel contenant 1 X de Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Liège, Belgique) et 200 nM de chaque amorces (**Annexe 3**). Le profil thermique utilisé était : 3 min à 95°C suivi de 40 cycles à 95°C pendant 3 sec et 30 sec à 60°C. La spécificité des amplicons a été vérifiée par l'analyse d'une courbe de fusion (15 sec à 95°C, 1 min à 60°C suivie d'une augmentation de 0.5°C toutes les 15 sec afin d'atteindre 95°C). Toutes les réactions ont été réalisées en triplicat. Les valeurs de Ct ont été déterminées en utilisant le logiciel StepOne v2.3 en gardant les paramètres par défaut. Pour chaque gène cible, les valeurs de Ct des échantillons foliaires à analyser ont été projetées sur la droite standard, donnant ainsi la quantité d'ADNg cible.

2.4. Analyses phylogénétiques des souches de *C. cassiicola*

Pour construire un arbre phylogénétique décrivant la diversité de l'espèce *C. cassiicola* en Afrique de l'Ouest, un alignement de quatre loci concaténé (ADNr *ITS*, *caa5*, *ga4* et *act1*) de 316 souches de *C. cassiicola* provenant d'hôtes et d'origines géographiques variées a été effectué (**Annexe 4**). Parmi elles, 187 souches provenaient de notre collection, dont 70 décrites précédemment (Déon *et al.*, 2014) et 117 nouvellement isolées de 2012 à 2017. De plus, les séquences de 128 souches disponibles sur NCBI ont été ajoutées à l'analyse, dont 57 provenant de l'étude de Dixon *et al.* (2009) d'hôtes et d'origines variés, 26 isolées à partir de feuilles d'hévéa collectées en Malaisie (Shuib *et al.*, 2015) et 46 isolées en Chine sur feuilles divers hôtes dont le concombre, l'hévéa, la tomate ou encore l'aubergine (Wu *et al.*, 2018). La souche de *Corynespora olivacea* D58-NE-Ts (Dixon *et al.*, 2009) a été sélectionnée en tant que groupe externe afin d'enraciner l'arbre. Une autre analyse phylogénétique a été réalisée à partir de l'alignement de 96 séquences des gènes codant la cassiicoline d'une partie des souches de *C. cassiicola* utilisée lors de l'analyse précédente (**Annexe 4**).

Pour les deux analyses phylogénétiques, les séquences ont été alignées à l'aide du programme Muscle du logiciel Geneious Pro v10.2.3. Les arbres ont été générés à l'aide du logiciel MEGA7 v7.0.21 en utilisant la méthode de distance NNI (Nearest Neighbor Interchange) avec des distances génétiques calculées par maximum de vraisemblance (maximum likelihood) selon le modèle HKY (Hasegawa, Kishino and Yano) avec des taux de substitution entre sites distribués selon une loi gamma (G+I). La robustesse des nœuds a été évaluée avec la technique du 'bootstrap' sur 1000 répliques. Le rendu de l'arbre a été finalisé en ligne à l'aide du site iTOL (<https://itol.embl.de/>). Le seuil de la valeur de 'bootstrap' a été arbitrairement placé à 70%.

2.5. Expression du gène *Cas1* par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Pour comparer les profils d'expression du gène *Cas1* sur des spores en germination des souches CCP, CCAM3, CNig407, CCI501 appartenant au clade C et CGha602 et CCI405 appartenant au clade A, une qPCR quantitative en temps réel (qPCR) a été effectuée. La suspension de spores a été préparée à partir de mycélium âgé d'une semaine placé à 26°C en alternance jour/nuit (photopériode 12h) pendant deux jours. Les spores ont été récoltées dans de l'eau stérile et filtrées à travers un tamis cellulaire d'une porosité de 100 µm de diamètre (Biologix Group Ltd, Jinan, Chine). Elles ont ensuite germé dans du milieu liquide MEB (Malt Extract Broth, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), pendant 24h sous agitation permanente de 150 rpm. Puis, elles ont été centrifugées à 8 000 g pendant 30 minutes à température ambiante et les culots ont été immédiatement congelés et broyés dans de l'azote liquide. Les ARNs totaux ont été extraits dans du tampon d'extraction CTAB additionné de 0,2 g de billes de verre stérile (425–600 µm, acid-washed, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) selon le protocole décrit par Chang *et al.* (1993). Puis, ils ont été traités à la RNase-free RQ1 DNase (Promega, Madison, WI, USA). Une transcription inverse a été réalisée à partir d'1 µg d'ARNs totaux en utilisant l'enzyme SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suivant les instructions du fournisseur. Les réactions d'amplification par qPCR, effectuées à partir de 2 µl d'ADNc dilué au 1/40, le profil thermique utilisé et la création de la courbe de fusion sont les mêmes que précédemment (voir la partie 2.3).

Le gène *Cas1* a été amplifié à l'aide des amorces Cc-qCas1-F1 et Cc-qCas1-R1 (**Annexe 3**). Pour la normalisation, les gènes de référence *EF1a*, *Actin*, and *β-tubulin* de *C. cassicola* ont été amplifiés à l'aide des couples d'amorces Cc-qEF1a-F1/R1, Cc-qActin-F1/R1 et Cc-Btub-F1/R1, respectivement (**Annexe 3**). Pour chaque échantillon, un indice de normalisation (Bestkeeper index) a été calculé à l'aide de l'outil BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), correspondant à la moyenne géométrique des valeurs de Ct obtenues pour les trois gènes de références. L'écart par rapport à la moyenne de tous les indices BestKeeper a ensuite été soustrait de la valeur de Ct obtenue avec les amorces spécifiques de *Cas1*. La méthode de calcul d'accumulation des transcrits utilisée est celle décrite par Lopez *et al.* (2012). Une droite de régression linéaire a été créée arbitrairement allant de 0 à 100, correspondant respectivement aux valeurs de Ct du gène *Cas1* les plus élevées (40) et les plus petites (20). Les accumulations de transcrits des échantillons inconnus ont ensuite été déterminées en fonction de la position de leurs valeurs de Ct du gène *Cas1* sur la droite de régression.

3. Résultats

3.1. Diversité de l'inoculum naturel fongique en Afrique de l'ouest

Afin d'identifier quels champignons étaient **responsable des symptômes foliaires** observés sur des plantations d'hévéas d'Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire, Libéria, Ghana et Nigéria), des isolements mycéliens ont été réalisés de 2012 à 2017 sur des feuilles malades d'hévéa mais aussi de manioc, de papaye et de pueraria. Ces plantes, parfois présentes dans, ou à proximité des parcelles d'hévéas, peuvent être des réservoirs potentiels de maladies. Certaines feuilles saines ont également été collectées ponctuellement afin d'isoler des champignons endophytes ou des potentiels pathogènes latents.

3.1.1. Genres fongiques associés aux nécroses foliaires (feuilles malades)

Près de 80% des isolements mycéliens (628 au total) ont été réalisés à partir de feuilles malades (**Tableau 7** et **Annexe 2**). Sur feuilles d'hévéa, nous avons isolé **19 genres fongiques** différents sur un total de 583 isolements. *Colletotrichum* est le genre le plus fréquemment isolé (34,1%), suivi par *Corynespora* (31,8%), *Diaporthe* (14%) et *Guignardia* (6,9%). Les autres genres représentant moins de 3% des souches isolées dont certains retrouvés qu'une seule fois (*Cercospora*, *Coniothyrium*, *Leptostroma*, *Lophiostoma* et *Mycoleptodiscus*). *Corynespora* a été retrouvé dans la papaye (où il est le genre le plus représenté) mais pas dans le manioc ni dans le pueraria, alors que *Colletotrichum* a été retrouvé chez les quatre plantes hôtes.

Tableau 7 – Proportion des différents genres de champignons isolés à partir de feuilles malades d'hévéa, de manioc, de papaye et de pueraria, prélevées en Afrique de l'Ouest (de 2012 à 2017)

Genre fongique	Hévéa	Manioc	Papaye	Pueraria	Total général
<i>Colletotrichum</i>	197	4	6	4	211
<i>Corynespora</i>	184		9		193
<i>Diaporthe</i>	81	3	3		87
<i>Guignardia</i>	40				40
<i>Daldinia</i>	18	2	1	3	24
<i>Xylaria</i>	16	2		1	19
<i>Lasiodiplodia</i>	14				14
<i>Fusarium</i>	7			1	8
<i>Bipolaris</i>	7				7
<i>Curvularia</i>	4			1	5
<i>Hypoxylon</i>	3		1		4
<i>Periconia</i>	3				3
<i>Pestalotiopsis</i>	1	1		1	3
<i>Cladosporium</i>	1		1		2
<i>Cercospora</i>	1				1
<i>Coniothyrium</i>	1				1
<i>Leptostroma</i>	1				1
<i>Lophiostoma</i>	1				1
<i>Mycoleptodiscus</i>	1				1
Total général	583	12	22	11	628

Les souches isolées à partir de feuilles d'hévéa malades proviennent de 22 clones différents, dont les plus représentés sont IRCA18, RRIM802 et RRIM921. La **Figure 27** donne le nombre d'isolats des genres les plus fréquents (*Colletotrichum*, *Corynespora*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Daldinia* et *Xylaria*), obtenus à partir de feuilles malades de différents clones d'hévéa provenant de Côte d'Ivoire (Bongo, Toupah et SOGB), du Nigéria, du Libéria et du Ghana.

La majeure partie des isolements (424) a été fait sur des feuilles collectées en Côte d'Ivoire (**Figure 27-A**), ce qui nous permet de suivre la composition de l'inoculum naturel sur différentes saisons et années. Ainsi, sur les plantations Toupah et SOGB, nous pouvons observer une **variabilité saisonnière et/ou phénologique** de cette composition.

Sur **jeunes feuilles** à la refoliation (**mars**), seuls *Corynespora* et *Colletotrichum* ont été isolés : en mélange sur RRIM921 et RRIM802 à la SOGB, mais uniquement *Corynespora* sur FDR5597 (SOGB) et IRCA18 (Toupah). Ces résultats sont confirmés à Bongo où ces deux champignons ont été co-isolés sur IRCA18 et où *Colletotrichum* a été isolé seul sur les clones IRCA631 et RRIC100.

En fin d'année (**octobre à décembre**), sur **feuilles matures**, la diversité est beaucoup plus importante. La diversité la plus grande a été observée en novembre 2016 sur IRCA18 à Toupah, et en octobre 2015 sur RRIM802 à la SOGB, où cinq genres sur six sont représentés en proportions parfois équivalentes. *Guignardia* est le genre le moins retrouvé (IRCA18 à Toupah et RRIM921 à la SOGB) alors que *Diaporthe* est systématiquement isolé. A cette période de l'année, *Corynespora* et *Colletotrichum* ont été rarement co-isolés : IRCA18 à Toupah et RRIM802 à la SOGB. De plus, en novembre 2017 sur RRIM802 et RRIM921 (SOGB), seuls des champignons des genres *Diaporthe*, *Daldinia* et *Xylaria* ont été identifiés.

Les résultats d'isolement pour les autres pays ne concernent à chaque fois que des feuilles prélevées en début d'année (mars à mai) sur une seule plantation (**Figure 27-B**). Comme observé précédemment en Côte d'Ivoire, pour la moitié des clones on ne retrouve que du *Corynespora* et du *Colletotrichum* (co-isolés sur GT1 au Nigéria et sur CDC56 et MDX624 au Ghana ; uniquement *Corynespora* sur IRCA109 au Libéria ; uniquement *Colletotrichum* sur IRCA18 et PB217 au Ghana). Pour l'autre moitié des clones, des souches du genre *Diaporthe* ont été co-isolés avec ces deux champignons (IRCA18 et RRIC103 au Nigéria ; IRCA18 au Libéria ; GT1 et FDR4575 au Ghana) ou avec *Corynespora* seulement (IRCA41 au Libéria). Aucun autre genre n'a été identifié sur ces feuilles.

Malgré la présence de *Diaporthe* sur quelques clones d'hévéa, *Corynespora* et *Colletotrichum* sont **systématiquement associés** aux nécroses lors de la saison sèche (mars).

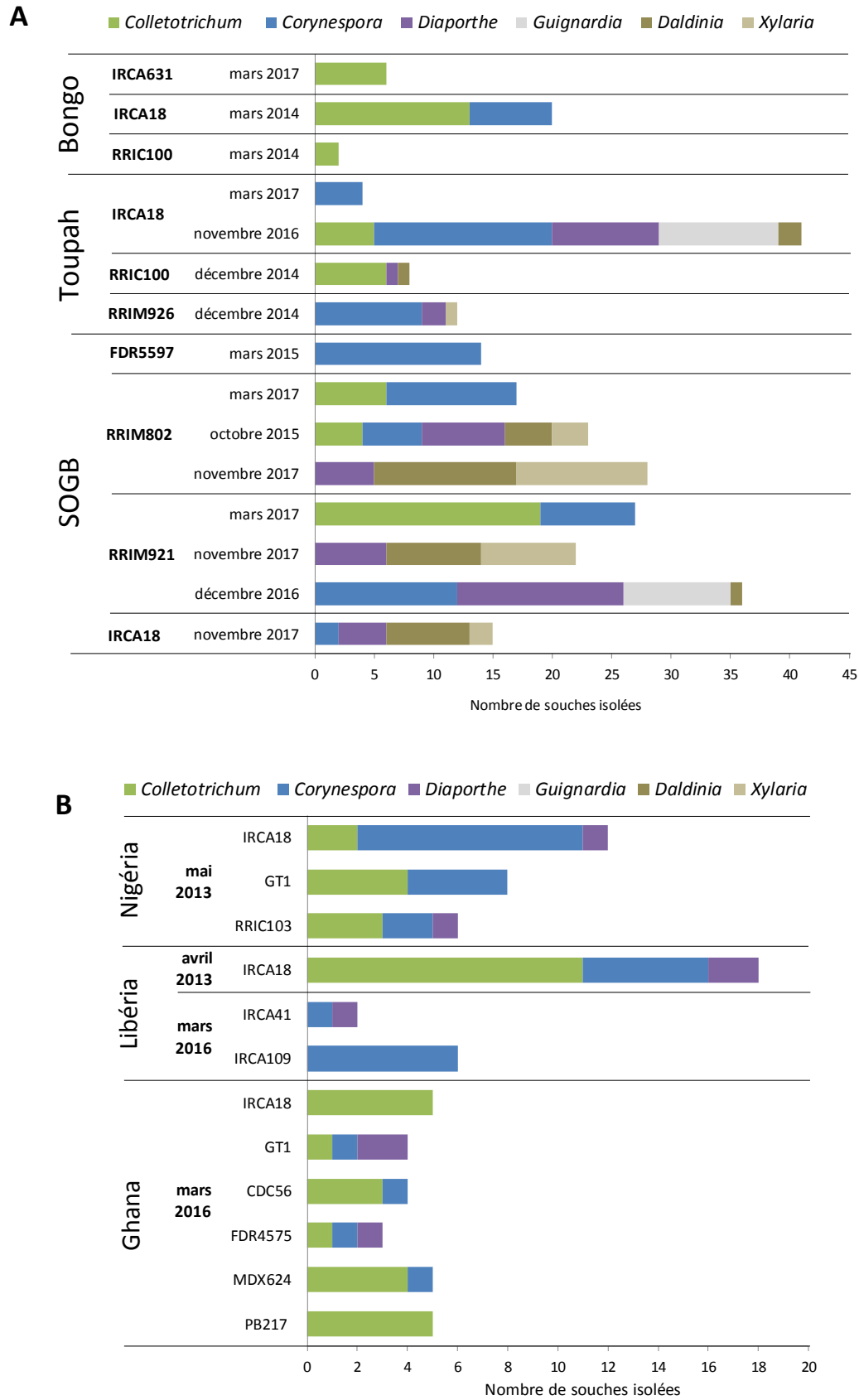


Figure 27 – Proportion des genres les plus représentés dans les feuilles malades de différents clones d'hévéas provenant des plantations Bongo, Toupah et SOGB de Côte d'Ivoire (A), du Nigéria (Okumu), du Libéria (LAC) et du Ghana (GREL) (B).

3.1.2. Genres fongiques associés aux feuilles saines

Sur feuilles saines, nous avons isolés **14 genres fongiques** différents sur un total de 155 isollements (**Tableau 8** et **Annexe 2**). La plupart des genres les plus représentés sont les mêmes que ceux obtenus sur feuilles malades mais leur classement diffère. Chez l'hévéa, *Guignardia* est le genre le plus fréquemment isolé (41,1%), suivi par *Colletotrichum* qui présente des proportions équivalentes à celles trouvées sur feuilles malades (~30%) puis par *Corynespora* qui est trois fois moins abondant (10,5%). Les autres genres (comprenant *Diaporthe*, *Daldinia* et *Xylaria*) n'ont été isolés qu'entre une et cinq fois seulement. D'ailleurs, *Diaporthe* est le genre dont les effectifs ont le plus chuté, passant de 83 isolats sur feuilles malades à 3 isolats sur feuilles saines. Cependant, il faut prendre en compte la taille de l'échantillonnage qui est six fois moins grand que sur feuilles malades, ce qui rend la comparaison difficile à interpréter et à généraliser.

Chez les autres plantes (manioc, papaye et pueraria), les effectifs sont faibles mais sont comparables. *Colletotrichum* a été retrouvé sur ces trois plantes, dans les mêmes proportions que *Corynespora* sur la papaye alors que ce dernier n'a jamais été isolé à partir de manioc et de pueraria.

Tableau 8 – Proportion des différents genres de champignons isolés à partir de feuilles saines d'hévéa, de manioc, de papaye et de pueraria, prélevées en Côte d'Ivoire en 2014 et 2016

Genres fongiques	Hévéa	Manioc	Papaye	Pueraria	Total général
<i>Guignardia</i>	39	4	1		44
<i>Colletotrichum</i>	28	5	13	7	53
<i>Corynespora</i>	10		15		25
<i>Daldinia</i>	5			1	6
<i>Diaporthe</i>	3	1	1	3	8
<i>Hypoxylon</i>	2				2
<i>Nigrospora</i>	2		3		5
<i>Myrothecium</i>	1				1
<i>Pestalotiopsis</i>	1				1
<i>Xylaria</i>	1				1
<i>Arthrinium</i>		1			1
<i>Fusarium</i>				1	1
<i>Periconia</i>			2		2
<i>Phoma</i>		1	1		2
Total général	95	12	36	12	155

Les isollements sur feuilles saines n'ont été réalisés qu'à quelques dates : mars, juin et décembre 2014 et juin 2016 (**Annexe 2**). La **Figure 28** donne le nombre d'isolats des genres *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Daldinia* et *Xylaria*, effectués sur différents clones d'hévéa à partir de feuilles saines provenant des plantations Bongo, Toupah/Ousrou et SOGB (Côte d'Ivoire).

Au contraire de ce qu'on a pu observer sur feuilles malades, il n'y a **pas d'effets de la saison ou de la phénologie** sur la composition de l'inoculum fongique. Il y a autant de diversité en début qu'en fin d'année, même si elle est légèrement plus faible en milieu d'année (juin 2014 et 2016). De manière générale, pas plus de trois genres sur six ont été identifiés sur un même clone, pour une plantation et une date donnée. Il s'agit de *Guignardia* et/ou de *Colletotrichum*, isolés chez tous clones (sauf IRCA18 à Bongo). Les autres genres (*Corynespora*, *Diaporthe*, *Daldinia* et *Xylaria*) n'ont été isolés que sur la moitié des clones de mars à décembre (RRIC100 et IRCA18 à Bongo ; IRCA41 à la SOGB ; IRCA41, FDR4575, RRIM926, RRIC100 et IRCA18 à la Toupah/Ousrrou).

Pour conclure, les genres *Colletotrichum* et *Guignardia* sont systématiquement associés aux feuilles saines, quel que soit le clone ou la période de l'année. Suggérant que ces souches sont soit des **endophytes**, soit des **pathogènes latents**.

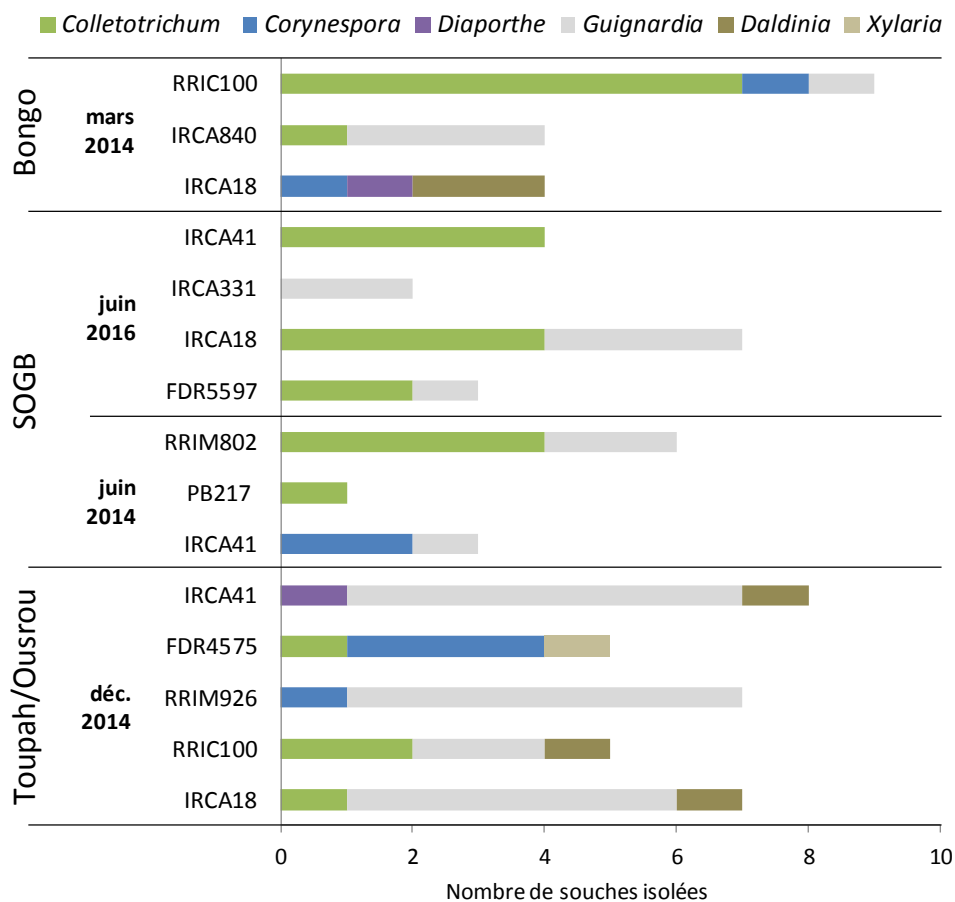


Figure 28 – Proportion des genres *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Daldinia* et *Xylaria* isolés à différentes dates à partir de feuilles saines de différents clones d'hévéas provenant des plantations Bongo, Toupah/Ousrrou et SOGB (Côte d'Ivoire).

Pendant la période de refoliation de l'hévéa (feuilles jeunes), il est difficile de distinguer visuellement les symptômes liés à la CLF de ceux liés à l'antracnose. Sachant que les deux champignons présentent un mode de vie endophyte. Il faudrait ré-inoculer systématiquement chaque champignon sur les feuilles du clone dont il est issu (postulat de Koch). Dans ce sens, une tentative de ré-inoculation avait été testée sur les clones PB260 et RRIM600 avec les spores des champignons *Corynespora*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia*, *Xylaria*, *Daldinia* et *Diaporthe* isolés à partir de feuilles du clone RRIM802 prélevé à la SOGB en octobre 2015 (non montré). Seules les feuilles inoculées avec *C. cassiicola* et *Colletotrichum* présentaient des symptômes, preuve supplémentaire qu'il s'agit des deux seuls pathogènes à risque sur les plantations africaines. Seulement, il est impossible de réaliser ce genre d'expérimentation pour tous les champignons isolés à cause du coût en temps, en main d'œuvre et en matériel végétal.

Ainsi, nos résultats suggèrent que seuls des champignons appartenant aux genres ***Corynespora* et *Colletotrichum* sont responsables des symptômes observés en période de refoliation de l'hévéa (mars)**. Seulement, il est très difficile de trancher quant à la responsabilité de l'un de ces deux champignons dans l'apparition de la maladie. D'une part, parce qu'ils sont souvent co-isolés, et d'autre part parce que des isolats de *Colletotrichum* ont souvent été retrouvés sur des feuilles asymptomatiques, laissant planer le doute sur le mode de vie de la souche isolée (endophyte ou pathogène). Quant au genre *Diaporthe*, retrouvé principalement sur feuilles malades, il n'a jamais été isolé seul mais a souvent été associé avec *Corynespora* et/ou *Colletotrichum*, suggérant un mode de vie opportuniste. Finalement, l'isolement mycélien n'est vraiment efficace que lorsqu'un seul genre est isolé sur un échantillon foliaire présentant des nécroses. D'où la nécessité de **trouver de nouvelles méthodes de détection de la maladie CLF** mais également de la maladie antracnose causée par des espèces du genre *Colletotrichum*.

3.2. Méthode de diagnostic moléculaire des maladies CLF et antracnose

La méthode de diagnostic après isolement mycélien est longue, non exhaustive et peu quantitative. En travaillant sur du matériel végétal frais, nous pouvons supposer que certaines espèces se développent durant le transport des feuilles, ce qui fausserait les proportions lors de l'analyse en laboratoire. De plus, la sélection de quelques nécroses sur les feuilles malades pour la mise en culture, crée un biais propre à l'expérimentateur. Pour pallier ce biais, nous avons testé une méthode de **diagnostic moléculaire direct par PCR quantitative en temps réel (qPCR) prenant en compte la feuille dans sa globalité, sans isolement préalable**. Nous nous sommes focalisés sur l'espèce *Corynespora cassiicola* et sur le genre *Colletotrichum*, pour deux raisons : (i) ce sont les deux principaux pathogènes associés aux nécroses foliaires sur hévéa et (ii) ils sont très difficiles à différencier en diagnostic visuel.

Juste après la récolte sur l'arbre, les feuilles ont été séchées une nuit à 50°C afin de stopper ou du moins ralentir le développement de champignons opportunistes. Au laboratoire, deux méthodes de prélèvement ont été testées : soit la totalité de la feuille a été prélevée (**méthode 1**), soit les parties nécrosées et "vertes" d'une même feuille ont été traitées séparément (**méthode 2**). Dans ce deuxième cas, l'objectif est double. Dans les échantillons enrichis en nécroses, on améliore le diagnostic en évitant la dilution de l'ADNg fongique dans l'ADNg d'hévéa. Dans les échantillons enrichis en parties "vertes" on vérifie la présence d'éventuel endophytes dans les tissus sans nécroses.

Le séquençage des régions ITS de 110 souches du genre *Colletotrichum* issues des isolements mycéliens a permis d'identifier trois groupes distincts au sein de notre collection (nommés Gr1, Gr2 et Gr3) correspondant à trois complexes d'espèces. Des amorces spécifiques ont été dessinées pour chacun de ces groupes (**Annexe 3**). Un seul couple d'amorces (Caa5-F4/R4 ; **Annexe 3**) a été utilisé pour l'identification de l'espèce *C. cassicola*, ciblant le locus *caa5* utilisé dans l'analyse phylogénétique des souches du champignon (Dixon *et al.*, 2009 ; Déon *et al.*, 2014). La spécificité des amorces a été vérifiée par PCR sur l'ADNg de 16 souches fongiques de différents genres isolées à partir de feuilles d'hévéa malades (*Bipolaris*, *Cercospora*, *Choanephora*, *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Hypoxylon*, *Lasiodiplodia*, *Leptostroma*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Periconia* et *Xylaria*) et sur l'ADNg de feuilles d'hévéa saines prélevées en serre (clones PB217 et IRCA18).

3.2.1. Détection de *C. cassicola* et de *Colletotrichum* dans des feuilles d'hévéas malades selon la méthode 1 (prélèvement feuille entière)

Nous avons d'abord testé la méthode de diagnostic moléculaire par qPCR sur **feuilles entières**. Les **Figure 29** et **30** présentent les résultats obtenus sur des feuilles malades des clones RRIM802 et RRIM921, respectivement, prélevées en Côte d'Ivoire (SOGB) en mars et novembre 2017. Des isolements mycéliens ont été réalisés en parallèle sur les mêmes clones, prélevés au même moment mais sur des feuilles différentes. Le but étant de comparer les deux techniques.

Sur le clone **RRIM802** (**Figure 29**), la **présence des deux champignons** a été détectée en **mars 2017** dans toutes les feuilles, avec une prépondérance de *C. cassicola* dans les feuilles F2 et F4 et de *Colletotrichum* Gr3 dans la feuille F3 (**Figure 29-A**). Le groupe 3 étant par ailleurs le plus représenté parmi tous les groupes de *Colletotrichum*. A cette période de l'année, les quantités d'ADNg mesurées par qPCR sont très variables d'une feuille à l'autre : elles varient de 23 pg (feuille F1) à 714 pg (feuille F2) tous champignons confondus. La **quantité d'ADNg semblent alors corrélée à la densité de nécroses**, puisque l'on constate d'après les photos que les feuilles F1 et F5 présentent moins de nécroses que les autres feuilles (**Figure 29-C**). Enfin, les résultats

d'isolement mycélien montrent une certaine cohérence avec les résultats de qPCR étant donné que la présence des deux champignons est également observée (**Figure 29-B**). En effet, des souches de *C. cassiicola*, de *Colletotrichum* Gr1 et Gr3 ont été identifiées quel que soit la méthode, alors qu'aucune souche de *Colletotrichum* appartenant au groupe 2 n'a été détectée. Après vérification, il s'avère que les souches du Gr2 ont été isolées exclusivement à partir de feuilles de manioc et de papaye.

Les observations faites sur RRIM802 en mars 2017 se vérifient sur le **clone RRIM921 (Figure 30)**. Sur ce clone, les deux champignons ont également été décelés dans toutes les feuilles pour *C. cassiicola*, dans les feuilles F3 à F5 pour *Colletotrichum* Gr1 et dans les feuilles F2 à F5 pour *Colletotrichum* Gr3 (**Figure 30-A**). De plus, les faibles quantités d'ADNg détectées pour l'ensemble des champignons (de 6 à 70 pg) sont bien corrélées avec le faible nombre de nécroses présents sur les feuilles (**Figure 30-C**). Ces nécroses semblent d'ailleurs avoir été causées par *C. cassiicola* car les quantités d'ADNg de *Colletotrichum* sont extrêmement faibles (> 10 pg). Enfin, les données d'isolement mycélien montrent que *Colletotrichum* (Gr1 principalement) a été isolé plus souvent que *C. cassiicola* (**Figure 30-B**). Le fait que l'on ne détecte presque pas de *Colletotrichum* par qPCR nous laisse penser que, soit le champignon s'est développé dans les feuilles fraîches durant le trajet jusqu'en France, soit que le champignon est bien présent initialement dans toutes les feuilles analysées au niveau des nécroses mais en tant que saprophytes et non en tant que pathogène. Tout ceci montre bien que l'aspect quantitatif du diagnostic des maladies CLF et anthracnose est déterminant pour une bonne interprétation des données.

En **novembre 2017**, les résultats sont très similaires entre les clones RRIM802 et RRIM921. Quel que soit le clone, on ne détecte que très peu d'ADNg de *C. cassiicola* et pas du tout de *Colletotrichum*, alors que toutes les feuilles affichent de nombreuses nécroses (**Figure 29 et 30, F6 à F10**). Cela peut s'expliquer par le fait que ces feuilles âgées aient subies une attaque de *C. cassiicola* mais ont résisté (elles ne sont pas tombées de l'arbre). Les nécroses que l'on observe correspondent à de vieux symptômes et l'ADNg des souches responsables de ces symptômes a été dégradé. De plus, les isollements mycéliens montrent que sur les deux clones, seuls les genres *Daldinia*, *Xylaria* et *Diaporthe* ont été détectés à partir des nécroses (**Figure 29-B et 30-B, nov. 2017**). Ces champignons opportunistes auraient pu se développer dans les feuilles blessées mais ne sont en aucun cas à l'origine des symptômes.

Ainsi, les résultats prenant en compte la feuille dans sa globalité montrent que le diagnostic moléculaire par qPCR est **sensible** (détection d'ADNg en pg), **quantitatif** (ADNg fongique proportionnel à la densité de nécroses foliaires sur jeunes feuilles) et **rapide** (une semaine contre un mois pour la méthode d'isolement mycélien).

RRIM802

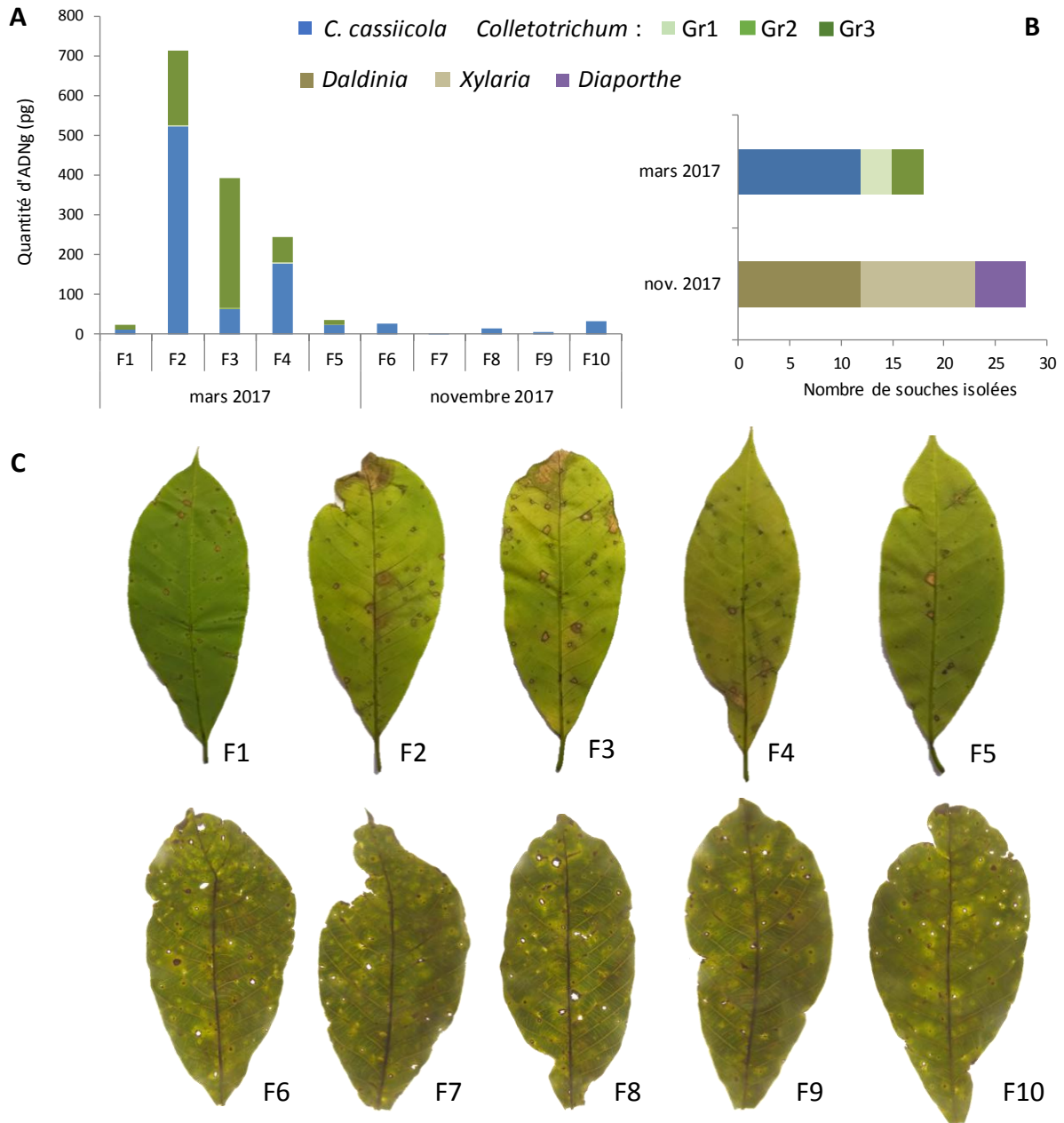


Figure 29 – Détection de la présence de *C. cassiicola* et de *Colletotrichum* dans des feuilles malades d'hévéa (clone RRIM802) prélevées en Côte d'Ivoire (SOGB)

Dix feuilles du clone RRIM802 présentant des nécroses ont été collectées en Côte d'Ivoire sur la plantation SOGB, en mars et novembre 2017. Pour chaque date de prélèvement (mars ou novembre), cinq feuilles ont été séchées une nuit à 50°C avant d'être expédiée en France pour une analyse par qPCR (A) et cinq feuilles non séchées ont contribué à l'isolement mycélien (B). La quantité d'ADNg (pg) des feuilles a été mesurée par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de *C. cassiicola* et de trois complexes d'espèces du genre *Colletotrichum* (Gr1, Gr2 et Gr3). Les feuilles servant à l'analyse qPCR (F1 à 10) ont été photographiées juste après leur prélèvement en Côte d'Ivoire (C).

RRIM921

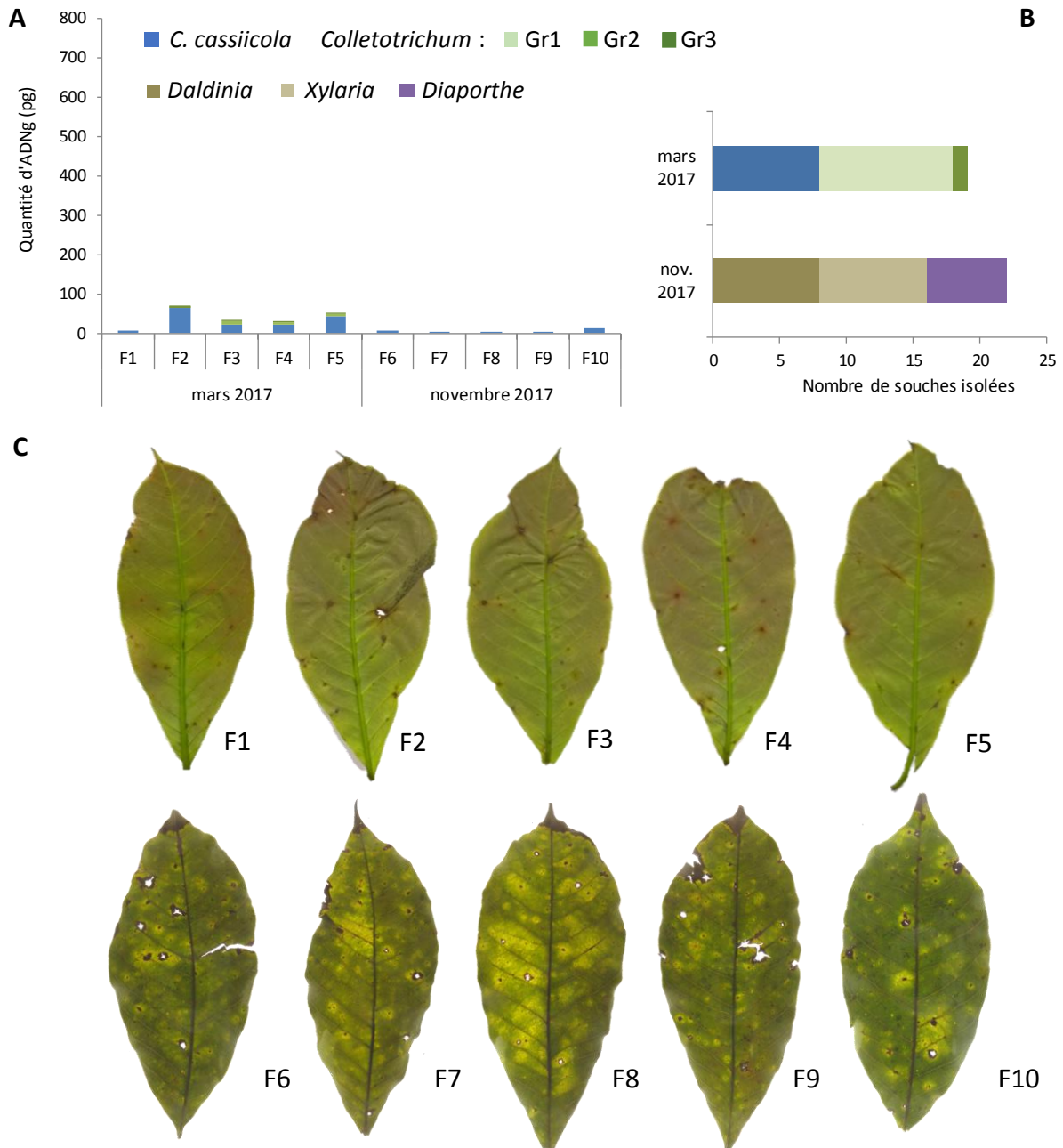


Figure 30 – Détection de la présence de *C. cassiicola* et de *Colletotrichum* dans des feuilles malades d'hvéa (clone RRIM921) prélevées en Côte d'Ivoire (SOGB)

Dix feuilles du clone RRIM921 présentant des nécroses ont été collectées en Côte d'Ivoire sur la plantation SOGB, en mars et novembre 2017. Pour chaque date de prélèvement (mars ou novembre), cinq feuilles ont été séchées une nuit à 50°C avant d'être expédiée en France pour une analyse par qPCR (A) et cinq feuilles non séchées ont contribué à l'isolement mycélien (B). La quantité d'ADNg (pg) des feuilles a été mesurée par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de *C. cassiicola* et de trois complexes d'espèces du genre *Colletotrichum* (Gr1, Gr2 et Gr3). Les feuilles servant à l'analyse qPCR (F1 à 10) ont été photographiées juste après leur prélèvement en Côte d'Ivoire (C).

3.2.2. Comparaison de feuilles saines et malades selon la méthode 1 (prélèvement feuille entière)

Afin de détecter d'éventuels souches **endophytes** de *C. cassiicola* et/ou de *Colletotrichum* dans les tissus foliaires de l'hévéa, la technique de diagnostic moléculaire par qPCR a été testée sur des feuilles malades (M) et saines (S) des clones GT1, IRCA18, RRIM802 et RRIM921, prélevées en Côte d'Ivoire (SOGB) en novembre 2017 (**Figure 31**). Les échantillons foliaires "M" des clones RRIM802 et RRIM921 correspondent en fait à la moyenne des cinq feuilles présentées dans les **Figure 29** et **30**. A cette période de l'année, la présence de *C. cassiicola* chez les clones IRCA18, RRIM802 et RRIM921 est détectée à des niveaux très faibles (< 50 pg), comparable entre les feuilles saines et malades. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les souches de *Corynespora* isolées pendant la saison sèche sont des formes endophytes ou des formes pathogènes latentes (voir partie 3.1). La présence de *Colletotrichum* n'a jamais été détectée à partir de feuilles saines. Seules les feuilles malades du clone GT1 contiennent de l'ADNg de *Colletotrichum*, en quantité élevée pour le Gr1 (~200 pg) et très faible pour le Gr3 (~ 10 pg). En mars, l'inverse avait été observé (voir partie 3.2.1) montrant qu'on n'identifie pas les mêmes souches en début et en fin d'année. Cependant, les clones analysés sur ces deux périodes ne sont pas les mêmes. Il pourrait tout simplement s'agir d'une spécificité clonale, sachant que le clone GT1 est connu comme étant très sensible à l'antracnose.

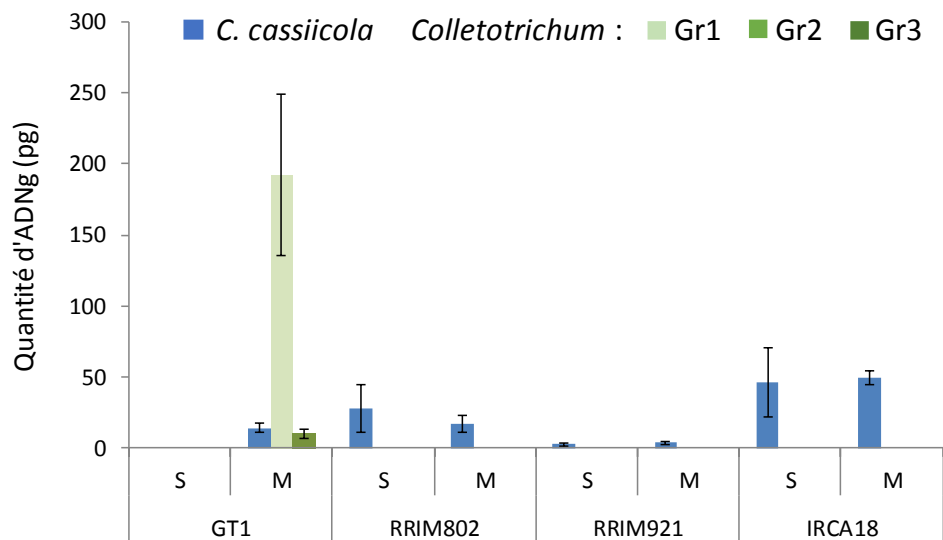


Figure 31 – Détection par qPCR de la présence de *C. cassiicola* et de *Colletotrichum* dans des feuilles d'hévéa prélevées en Côte d'Ivoire en novembre 2017

Cinq feuilles saines (S) et cinq feuilles malades (M) provenant des clones GT1, RRIM802, RRIM921 et IRCA18 ont été collectées en Côte d'Ivoire sur la plantation SOGB, en novembre 2017. La quantité d'ADNg (pg) des feuilles a été mesurée par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de *C. cassiicola* et de trois complexes d'espèces du genre *Colletotrichum* (Gr1, Gr2 et Gr3). Chaque échantillon correspond à la moyenne de cinq feuilles (S ou M).

3.2.3. Détection de *C. cassiicola* et de *Colletotrichum* dans des feuilles d'hévéas malades selon la méthode 2 (séparation des parties nécrosées et des parties "vertes")

La **Figure 32** présente les résultats du diagnostic moléculaire par qPCR obtenus après **séparation des nécroses (N) et des parties "vertes" (V)** de trois feuilles du clone IRCA18 prélevées à la SOGB (F1_B, F2_B et F3_B) et à la Toupah (F1_T, F2_T et F3_T) en mars 2017. Le but étant de vérifier si on améliore le diagnostic moléculaire par qPCR en concentrant l'ADNg présent dans les nécroses et si on détecte la présence de *C. cassiicola* et/ou de *Colletotrichum* dans les tissus "verts" d'une feuille nécrosée.

L'**enrichissement en nécroses augmente fortement la détection d'ADNg fongique**, comparativement aux feuilles entières. En effet, les quantités d'ADNg de *C. cassiicola* mesurées sur les parties nécrosées des deux plantations ont atteint 800 pg pour certaines feuilles (F2_B et F2_T) alors que sur feuilles entières la plus haute valeur plafonnait à environ 500 pg. On soulignera que les densités de nécroses étaient comparables entre les deux méthodes (voir photos). Les limites de ce test se bornent au nombre de nécroses identifiées sur la feuille. En effet, la présence des deux champignons est peu ou pas détectable sur les F1_B et F1_T (~20 pg) qui présentent très peu de nécroses. Enfin, on peut voir sur les photos que la feuille F3_T d'IRCA18 prélevée à la Toupah est recroquevillée. Ce symptôme est caractéristique d'une attaque de *Colletotrichum* dont la présence est confirmée en qPCR sur les deux plantations et dont la quantité d'ADNg est supérieure à celle de *C. cassiicola* (150 pg en moyenne). Comme observé précédemment, on détecte majoritairement des souches de *Colletotrichum* appartenant au groupe 3. Il serait intéressant par la suite de déterminer précisément à quelle espèce correspond ce groupe.

Dans les **parties "vertes"**, on ne détecte aucun groupe de *Colletotrichum* (sauf très faiblement dans l'échantillon F2_B à Bongo) et la présence de *C. cassiicola* est très faiblement détectable (< 60 pg) comparativement à ceux que l'on peut détecter dans les parties nécrosées. Il ne semble donc pas y avoir de formes endophytes de ces champignons dans ces feuilles, ou alors les amorces utilisées ne permettent pas de les détecter. Concernant *C. cassiicola*, les quantités d'ADNg résiduels dans les parties saines peuvent être dues à des débuts de nécroses encore peu développées (donc peu visible).

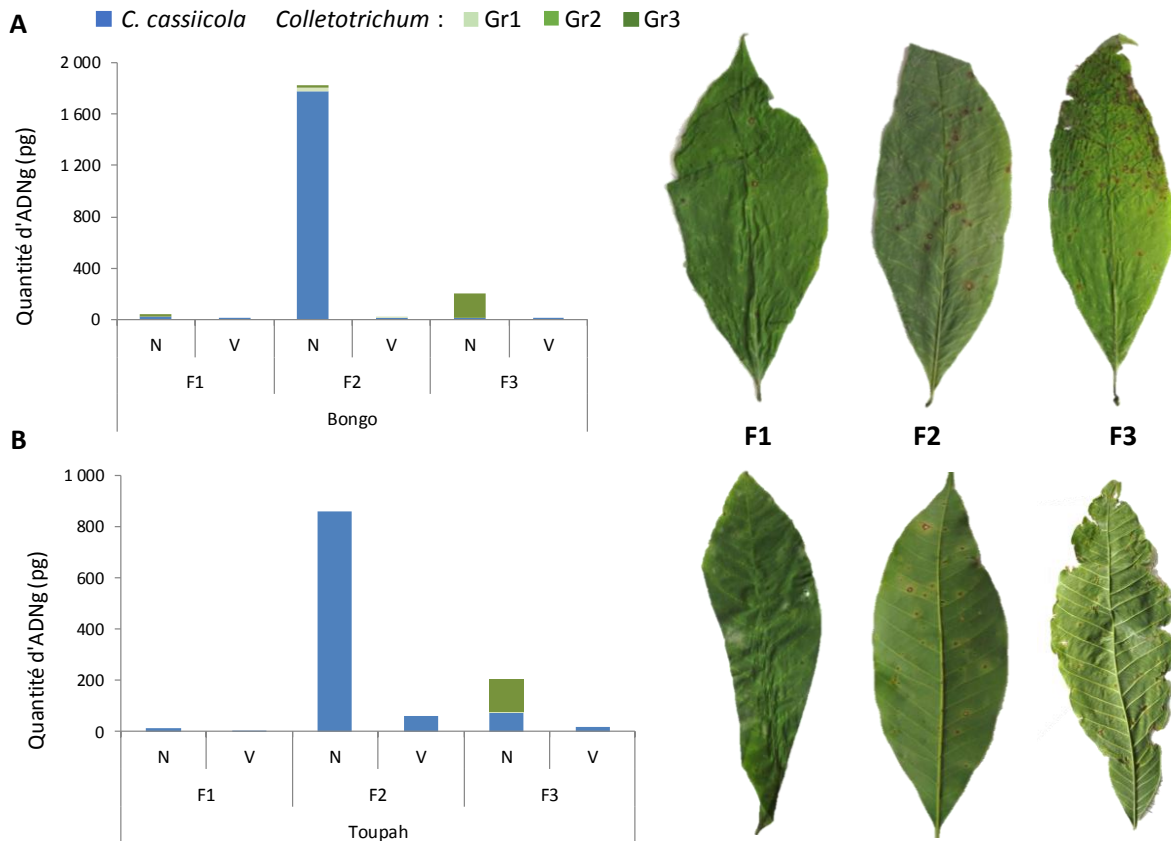


Figure 32 – Détection par qPCR de la présence de *C. cassiicola* et de *Colletotrichum* dans les parties nécrosées et "saines" des feuilles d'hévéa du clone IRCA18 prélevées en Côte d'Ivoire en mars 2017

Trois feuilles malades du clone IRCA18 ont été collectées en Côte d'Ivoire sur les plantations Bongo (haut) et Toupah (bas) en mars 2017. Pour chaque feuille (F1_B, F2_B et F3_B à Bongo ; F1_T, F2_T et F3_T à Toupah), les parties présentant des nécroses (N) ont été prélevées séparément des parties sans nécroses (ou parties "vertes", V). La quantité d'ADNg (pg) des feuilles a été mesurée par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de *C. cassiicola* et de trois complexes d'espèces du genre *Colletotrichum* (Gr1, Gr2 et Gr3). Les feuilles servant à l'analyse qPCR ont été photographiées juste après leur prélèvement en plantation.

La méthode de diagnostic direct par qPCR semble prometteuse pour analyser la dynamique des populations de *Corynespora* et *Colletotrichum* dans le cadre de **futures études épidémiologiques** et ainsi préciser leurs cycles respectifs, leurs préférences clonales et leurs possibles interactions. Elle pourra être un appui utile pour mieux interpréter les symptômes observés et donc la sensibilité des clones en plantation. Toutefois, nos résultats montrent que les clones IRCA18, RRIM802 et RRIM921 présentant le plus de symptômes et nécessitant parfois des arrachages, semblent subir préférentiellement des attaques de *C. cassiicola* car ce dernier est détecté en abondance dans les tissus foliaires. Il est alors nécessaire de s'intéresser à la diversité de ce champignon sur ces plantations d'Afrique de l'Ouest.

3.3. Diversité des souches de *C. cassicola* en Afrique de l'Ouest

Le test toxinique permet de tester rapidement, directement sur le terrain et à moindre coût la réponse de clones d'hévéa à un grand nombre de filtrats de culture de *C. cassicola*. Il est alors important de connaître la diversité de l'inoculum du champignon sur le lieu même des expérimentations. Seulement, la phylogénie décrite par Déon *et al.* (2014) ne comprenait que 11 souches africaines de *C. cassicola* (Cameroun, Gabon et Ghana). Nous avons enrichi cette collection avec 117 nouvelles souches isolées à partir de feuilles d'hévéa et de papaye provenant de Côte d'Ivoire, du Ghana, du Nigéria et du Libéria. Le but est de (i) **décrire la diversité des souches de *C. cassicola* en Afrique de l'Ouest** pour qu'elles puissent être évaluées pour leur agressivité en test toxinique mais aussi (ii) **d'estimer l'importance des souches porteuses de l'isoforme Cas1** par rapport à l'ensemble de l'inoculum du champignon.

3.3.1. Analyse phylogénétique basée sur quatre loci

Afin de **déterminer le groupe génétique** des souches de *C. cassicola* issues des isolements mycéliens réalisés en Afrique de l'Ouest et de les comparer avec d'autres souches issues d'études précédentes provenant d'hôtes et d'origines géographique variées, une analyse phylogénétique a été réalisée par l'alignement de quatre loci concaténés (ADNr *ITS*, *ga4*, *caa5* et *act1*) et par la construction d'un arbre phylogénétique utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (**Figure 33**). La classe toxinique a été indiquée lorsqu'elle était connue. Pour chaque clade, les proportions des différents hôtes et l'origine géographique des souches ont été représentées sous forme de nuages de mots (encadrés à fond gris).

Au total 315 souches ont été analysés, isolées à partir de feuilles de 50 plantes hôtes différentes dont l'hévéa (172 souches), le concombre (31 souches), la papaye (29 souches) ou encore la tomate (10 souches). Ces feuilles ont été prélevées dans 21 pays différents dont la plupart en Afrique (127 souches dont 100 en Côte d'Ivoire) et en Asie (103 souches dont 46 en Chine et 37 en Malaisie). Le reste étant réparti majoritairement entre le Brésil (33 souches) et certaines îles océano-américaines comme Palaos, Guam, Yap, Samoa américaines et Saipan (47 souches).

Cette nouvelle phylogénie conserve la plupart des clades majeurs identifiés par Déon *et al.* (2014). Seulement, comme presque tous les sous-clades disparaissent, nous avons fait le choix de ne pas les nommer et donc de ne garder que les clades majeurs, allant de A à H. Ainsi, les sous-clades A1, A2, A3 et A4 ne sont plus différenciés au sein du clade A. Il en est de même pour les clades B et F. Les clades soutenus par une valeur de 'bootstrap' supérieure à 70% sont les clades A, B, C, E, F et I. Les clades D, H et G ont été identifiés (entre parenthèse sur la **Figure 33**) mais présentent des valeurs de 'bootstrap' plus faible (59%, 51% et 65%, respectivement).

Presque la moitié des souches (44%) appartiennent au **clade A**. C'est le groupe qui contient la plus grande diversité en termes d'hôtes (21/50), d'origines géographiques (18/21) et de classes toxiques (Cas0, Cas1, Cas2, Cas2.2, Cas2+6 et Cas2+7).

Le **clade B** est le deuxième groupe majoritaire, comprenant 47 souches (15% de la phylogénie) isolées à partir de onze hôtes et onze pays différents. Sur les 34 isolats issus de feuilles d'hévéa, 22 ont été isolés en Malaisie.

Les **clades C et F** représentent tous deux 6% de l'analyse phylogénétique (20 isolats chacun), composés principalement de souches collectées en Afrique (Cameroun, Côte d'Ivoire, Ghana et Libéria) sur hévéa et dans les îles océano-américaines (Guam, Saipan, Samoa américaines et Yap) sur quinze plantes hôtes différentes, respectivement.

Les autres clades contiennent entre 2 et 10 isolats chacun, incluant : les **clades D, G et I** composés uniquement de souches africaines et brésiliennes, le **clade E** comportant dix souches isolées aussi bien en Afrique, qu'en Asie, en Amérique et en Océanie et le **clade H** composé de souches africaines et océaniques. Le clade I étant absent de la phylogénie initiale.

Enfin, une grande partie des souches (17%) n'appartient à aucun clade soutenu (NC pour Non Classé sur la [Figure 33](#)).

Les auteurs de Déon *et al.* (2014) avaient démontré qu'il existait une bonne concordance entre la classe toxinique et le clade phylogénétique. Dans notre phylogénie et en accord avec l'étude précédente, les souches de classes toxiques Cas2, Cas2.2, Cas2+6 et Cas2+7 n'ont été retrouvées que dans le clade A et celles de classe toxinique Cas5 sont spécifiques du clade B. Cependant, des isolats porteurs du gène *Cas1*, qui était alors associés aux isolats du clade C uniquement, ont été identifiés au sein du groupe A. De même pour Cas4 dont on retrouve de manière surprenante une souche dans le clade I. Comme démontré dans de précédents travaux, les souches porteuses du gène *Cas3* n'appartiennent à aucun clade soutenu et les souches dépourvues de cassiicoline (Cas0) sont dispersées dans tout l'arbre phylogénétique. Ces résultats indiquent qu'un transfert horizontal du gène codant la cassiicoline a pu avoir lieu entre des souches appartenant à différents groupes génétiques.

Dans cette étude phylogénétique, des souches de *C. cassicola* ont été isolées à partir de feuilles asymptomatiques prélevées en Côte d'Ivoire dont 8 sur hévéa et 14 sur papaye (indiquées par un "sain" après leur identifiant sur la [Figure 33](#)). Le but étant d'identifier des souches endophytes, potentiellement non virulentes. L'échantillonnage est faible mais nous pouvons constater que les souches isolées à partir de feuilles saines d'hévéa ne portent pas de gènes de cassiicoline. Sur la papaye cependant, nous avons identifié trois isoformes de la cassiicoline : Cas3, Cas4 et Cas5.

Classes toxiques :

Cas1

Cas2

Cas2.2

Cas2+6

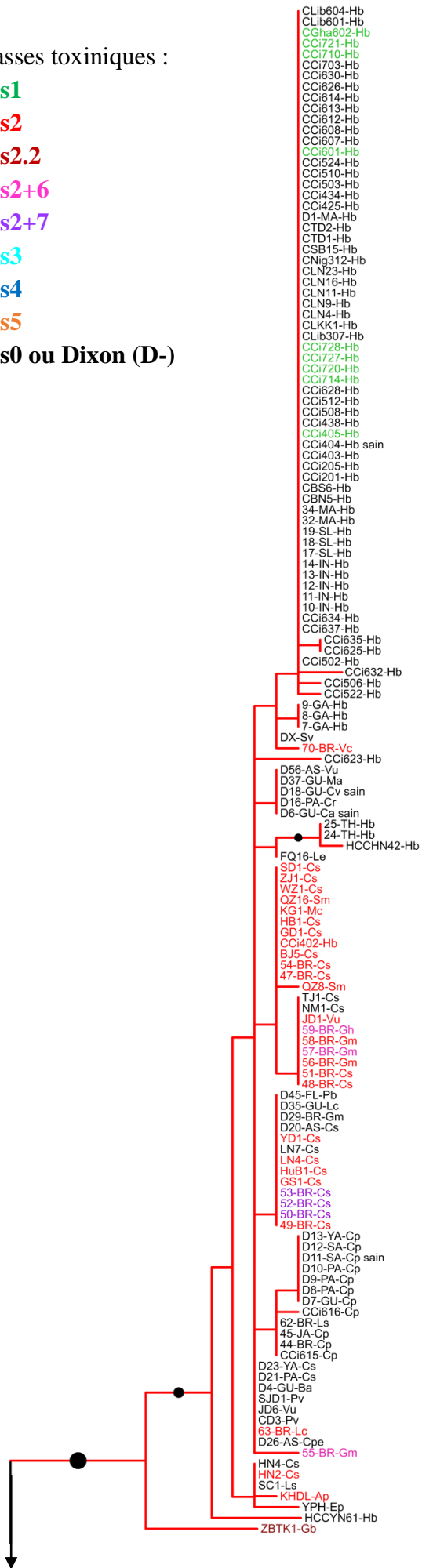
Cas2+7

Cas3

Cas4

Cas5

Cas0 ou Dixon (D-)



clade A

Hevea brasiliensis,

Cucumis sativus, *Carica papaya*,

Aeschynanthus pulcher, *Bidens alba*, *Capsicum*

annuum, *Catharanthus roseus*, *Codiaeum*

variegatum, *Cucurbita pepo*, *Euphorbia*

pulcherrima, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*,

Gynura bicolor, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon*

esculentum, *Macroptilium atropurpureum*,

Momordica charantia, *Plectranthus barbatus*,

Phaseolus vulgaris, *Solanum melongena*, *Syringa*

vulgaris, *Vernonia cinerea*, *Vigna unguiculata*

Afrique : Côte d'Ivoire,

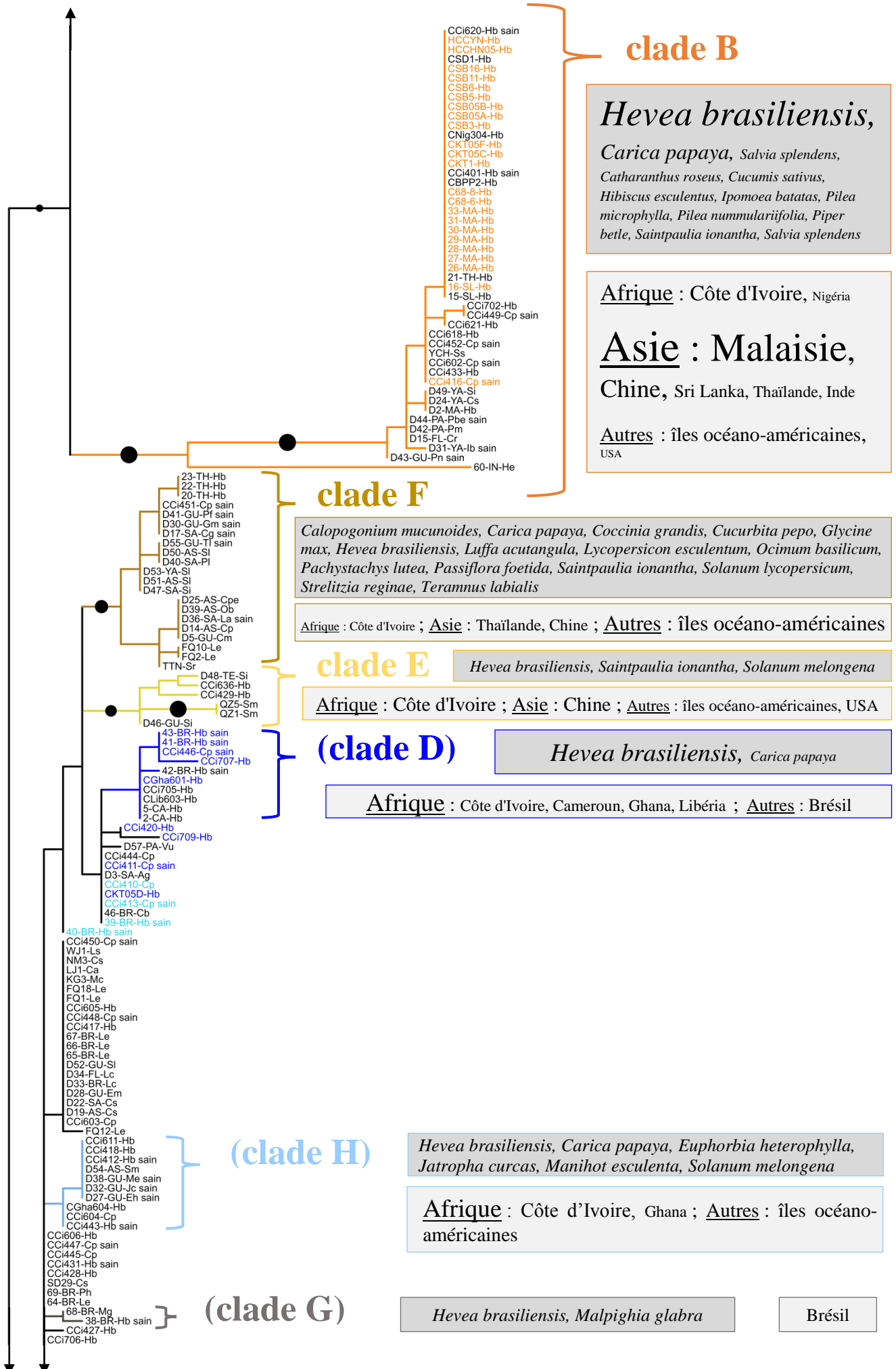
Gabon, Libéria, Ghana, Nigéria

Asie : Chine, Malaisie, Inde,

Sri Lanka, Thaïlande

Autres : Brésil, îles océano-

américaines, USA, Jamaïque



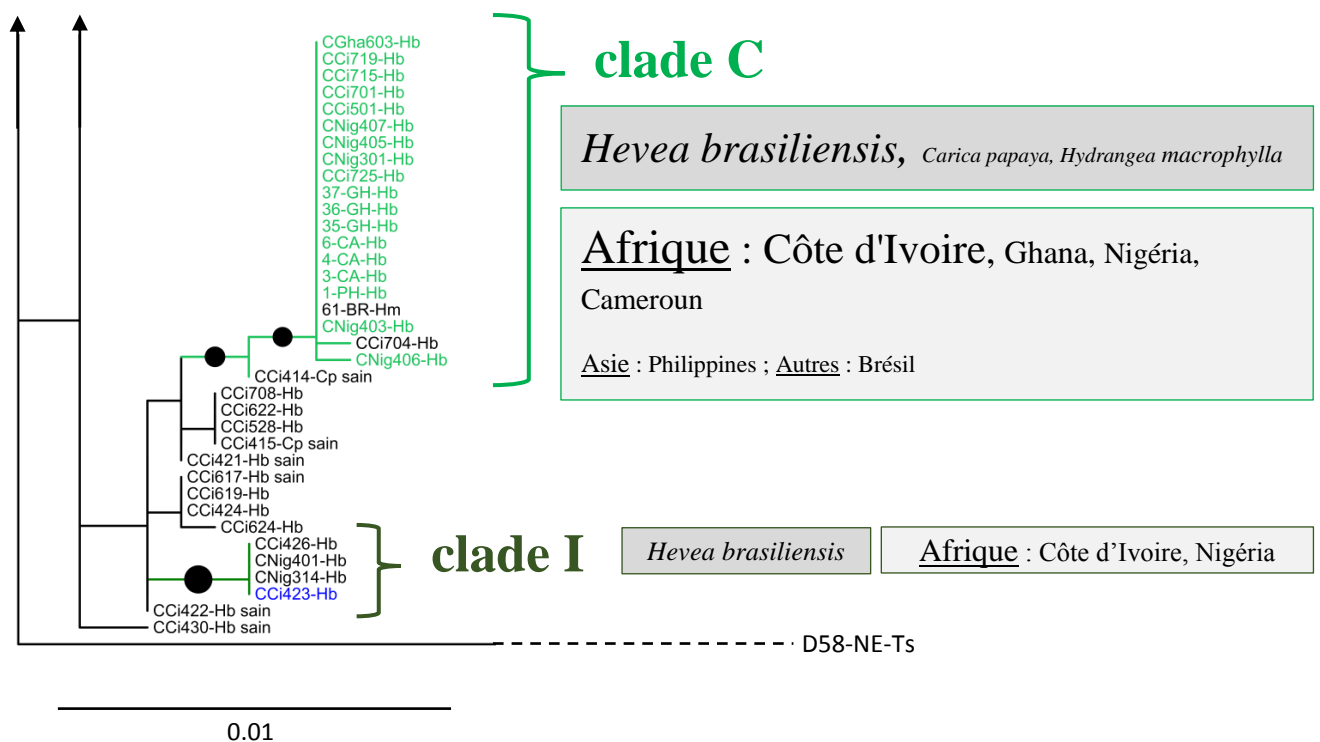


Figure 33 – Analyse phylogénétique de 316 de souches de *C. cassiicola* provenant d’hôtes et d’origines géographiques variées (Annexe 4).

L’arbre a été généré grâce à l’assemblage de 4 loci concaténés (ADNr *ITS*, *ga4*, *caa5* et *act1*), en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood). Parmi ces souches, 187 proviennent de notre collection personnelle dont 117 sont issues des isolements réalisés de 2012 à 2017 en Afrique de l’Ouest et 70 sont extraites de Déon *et al.* (2014). Les 129 autres souches ont été récupérées sur NCBI (Wu *et al.*, 2018; Shuib *et al.*, 2015; Dixon *et al.*, 2009).

Le nom de chaque souche intègre les initiales de la plante hôte à partir de laquelle elle a été isolée (Annexe 4). Vingt-deux souches issues de feuilles saines sont signalées par le terme "sain" derrière l’identifiant. Pour chaque souche, la classe toxinique a été indiquée par un code couleur (voir légende) : Cas1 en vert, Cas2 en rouge, Cas2.2 en brique, Cas2+6 en rose, Cas2+7 en violet, Cas3 en cyan, Cas4 en bleu foncé, Cas5 en orange et Cas0 en noir. La classe toxinique des isolats de Dixon (D1 à D58) n’a pas été testée, car ces isolats n’étaient pas disponibles pour l’analyse par PCR (code couleur noir).

Seuls les groupes présentant des valeurs de 'bootstrap' supérieures ou égale à 70% ont été identifiés comme des clades (cercles noirs pleins). Même s’ils présentent des valeurs de bootstrap inférieures à 70%, les clades D, H et G ont tout de même été indiqués sur la figure afin d’assurer une cohérence avec la phylogénie d’origine (Déon *et al.*, 2014). La souche D58.NE.Ts (*Corynespora olivacea*) a été utilisée en tant que groupe externe afin d’enraciner l’arbre (branche raccourcie indiquée en pointillés sur l’arbre). Pour chaque clade phylogénétique, les proportions des différentes plantes hôtes et des différentes origines géographiques ont été représentées en tant que nuage de mots (taille du mot proportionnelle à l’abondance) dans des encadrés gris sombre et gris clair, respectivement.

3.3.2. Analyse phylogénétique basée sur les gènes de cassiicoline

Sur l'ensemble des 315 souches de *C. cassiicola* décrites précédemment (**Figure 33**), seulement un isolat sur trois (96 souches) possède au moins un gène codant la cassiicoline. Ce qui fait de la classe toxinique **Cas0**, le groupe **le plus représenté** (219 souches). Afin d'établir un lien entre les gènes de cassiicoline et la provenance géographique et/ou la plante hôte, une analyse phylogénétique a été réalisée par l'alignement des 96 séquences nucléotidiques correspondant aux gènes Cas1 à Cas7 et par la construction d'un arbre phylogénétique utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (**Figure 34**).

Dans cette analyse, **six clades phylogénétiques majeurs** soutenus par une valeur de 'bootstrap' de 99-100% ont été retenus : Cas1, Cas2/Cas2.2, Cas3/Cas4, Cas5, Cas6 et Cas7. Nous retrouvons tous les clades décrits par Déon *et al.* (2014) à la particularité près que les clades Cas3 et Cas4 ne sont plus dissociés, et qu'ils peuvent même être regroupés avec le clade Cas5. Pour ces trois clades, les séquences protéiques sont très proches : leurs domaines matures sont strictement identiques et leurs peptides signal ne diffèrent que d'un ou deux acide(s) aminé(s). Le clade Cas7 apparaît dans cette nouvelle phylogénie et l'unique séquence Cas2.2 (ZBTK1-Gb) décrite par Wu *et al.* (2018) est associé au clade Cas2.

A une exception près, on voit apparaître dans certains clades des **préférences géographiques** et/ou des **spécialisations d'hôtes**. Ainsi, les souches porteuses du gène *Cas1* n'ont été isolées qu'à partir de feuilles d'hévéa provenant de plantations africaines, sauf 1-Ph-Hb (alias CCP, Philippines). Celles de classe toxinique Cas5 ont toutes été retrouvées sur hévéa en Asie, à l'exception de la souche CCI416-Cp isolée sur de la papaye saine en Côte d'Ivoire. Dans ce cas, l'analyse de la séquence nucléotidique de CCI416-Cp montre qu'elle diffère des autres souches Cas5 par la présence de SNP dans les régions introniques et UTR (mais pas CDS) mais dont elle partage 98.4% d'identité. Les séquences Cas3 et Cas4 sont relativement proches des séquences Cas5 ; les souches appartenant au clade Cas3/4 semblent spécifiques de l'hévéa et de la papaye, sans spécificité géographique. Les souches appartenant aux clades Cas6 et Cas7 ont été isolées à partir de lésions foliaires de plantes autres que l'hévéa (soja et coton pour Cas6, concombre pour Cas7), au Brésil ; ces souches se retrouvent également dans le clade Cas2, puisque qu'elles sont porteuses de deux gènes de cassiicoline. Cas2 est la classe toxinique présentant la plus grande diversité en termes de provenance et d'hôte : les souches de ce clade ont été retrouvées sur dix hôtes différents répartis sur trois continents (Amérique, Afrique et Asie).



Figure 34 – Analyse phylogénétique des gènes de cassioline de souches de *C. cassiicola* provenant d'hôtes et d'origines géographiques variées

L'arbre a été généré en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood). Parmi toutes ces souches, 30 proviennent des isollements réalisés de 2012 à 2017 en Afrique de l'ouest, 34 sont issues de Déon *et al.* (2014) et 32 ont été récupérées sur NCBI (Wu *et al.*, 2018; Shuib *et al.*, 2015). Pour chaque souche, le pays et l'hôte d'origine ont été indiqués dans la figure. Seuls les groupes présentant des valeurs de 'bootstrap' supérieures ou égales à 99% ont été identifiés comme des clades (cercles noirs pleins). Un code couleur a alors été assigné aux clades retenus : Cas1 en vert, Cas2/Cas2.2 en rouge/rouge brique, Cas3/Cas4 en bleu, Cas5 en orange, Cas6 en rose et Cas7 en violet.

3.3.3. Analyse d'expression du gène *Cas1* des souches appartenant aux clades A et C

Le niveau d'expression du gène *Cas1* a été mesuré sur les spores en germination de quatre souches C/Cas1 (CCP, CCI501, CCAM3 et CNig407) et deux souches A/Cas1 (CGha602 et CCI405) par PCR quantitative en temps réel (Figure 35). Le but était de vérifier si le gène *Cas1* est potentiellement fonctionnel dans les souches appartenant au clade A. Les souches CCP et CCAM3 ont été choisies comme référence car elles avaient déjà été testées pour une analyse d'expression de *Cas1* (Déon *et al.*, 2012). Puis, deux souches par clades (A et C) ont été choisies car elles ont été isolées à partir de feuilles d'hévéa provenant de deux pays d'Afrique de l'Ouest et prélevées à deux dates : CCI501 en Côte d'Ivoire en 2015, CNig407 au Nigéria en 2014 ; CGha602 au Ghana en 2016 et CCI405 en Côte d'Ivoire en 2014.

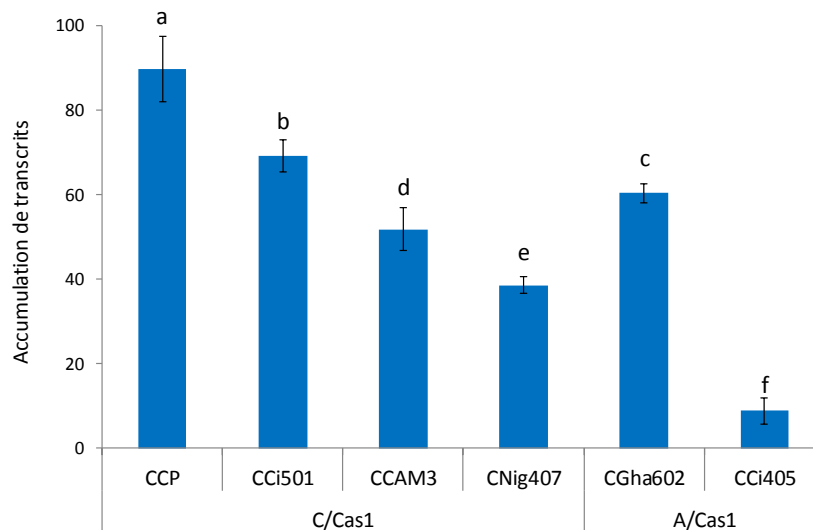


Figure 35 – Analyse par qPCR de l'accumulation de transcrits du gène *Cas1* de souches de *C. cassiicola* cultivées in vitro

L'expression du gène *Cas1* a été mesuré sur les spores en germination des souches CCP, CCI501, CCAM3, CNig407, CGha602 et CCI405. La normalisation a été effectuée en utilisant trois gènes de référence : *EF1 α* , *Actin*, and *β -tubulin*. Les barres représentent l'erreur standard à la moyenne d'au moins trois répliquas biologiques. Les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA et un test HSD de Tukey ($P < 0.05$).

Il existe une grande variabilité d'expression du gène *CasI* indépendamment du clade phylogénétique. La souche CCP (C/*CasI*) est celle qui produit le plus de transcrits *CasI* alors que CCI405 (A/*CasI*) n'en produit presque pas. Les autres souches ont des profils d'expression intermédiaires. Chez les souches CCI501, CGha602 et CCAM3, les niveaux de transcrits sont élevés alors que CNig407 accumule deux fois moins de transcrits que CCP mais quatre fois plus que CCI405. Il ne semble donc pas possible de faire le lien entre diversité génétique et production de cassiocoline des souches pour les souches *C. cassiicola* porteuses du gène *CasI*.

4. Discussion

4.1. *Corynespora* et *Colletotrichum* sont étroitement associés

Les travaux de ce premier chapitre de thèse ont révélé que les genres *Corynespora* et *Colletotrichum* étaient étroitement associés, dans les feuilles d'hévéa malades. En effet, ils sont fréquemment co-isolés à partir des mêmes clones, voir des mêmes feuilles, et parfois même à partir d'une même nécrose (**Tableaux 7 et 8, Figures 27 et 28**). Ceci a également été démontré par qPCR sans isolement préalable (**Figures 29 à 32**). Certaines nécroses dues à *Colletotrichum* sont bien reconnaissables (boursoufflure) mais ce n'est pas le cas sur jeunes feuilles. De plus, l'analyse comparative du génome de *C. cassiicola* (souche CCP) et de 45 autres génomes de champignons (Lopez *et al.*, 2018) a montré que la composition en effecteurs de *C. cassiicola* est proche de celle des espèces *Colletotrichum gloesporioides* et *Colletotrichum acutatum*. Ceci pourrait expliquer que ces espèces phylogénétiquement distinctes puissent s'adapter aux mêmes environnements écologiques et en particulier à un même hôte.

Les espèces *C. gloesporioides* et *C. acutatum* ont été décrites comme agents pathogènes de l'hévéa (Manju *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018; Brown and Soepena, 1994), bien que certaines souches aient également été isolées à partir d'hévéa asymptomatique (Gazis and Chaverri, 2010). Au sein de l'espèce *C. cassiicola*, des formes endophytes et saprophytes ont aussi été décrites (Cai *et al.*, 2006; Déon *et al.*, 2012b; Gond *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; Promptutha *et al.*, 2007; Suryanarayanan *et al.*, 2011). Cette diversité de modes trophiques est donc un point commun avec *Colletotrichum sp.* L'analyse qPCR a permis de montrer que toutes les souches de *Corynespora* et de *Colletotrichum* que nous avons isolées sur le clone IRCA18 sont bien associées aux zones nécrosées de la feuille et non pas présentes dans les parties vertes (**Figure 32**). Il s'agirait donc bien de formes pathogènes et non pas d'endophytes. Cependant, lorsque ces deux champignons sont co-isolés à partir des mêmes feuilles, voir des mêmes nécroses, il est difficile de déterminer avec certitude lequel est responsable de la chute des feuilles chez les clones les plus sensibles. Il est possible qu'il existe une interaction entre les deux mais la nature de cette interaction est encore

inconnue. L'un des deux peut être opportuniste et bénéficier de l'action nécrotrophe de l'autre ; les deux peuvent entrer en compétition l'un envers l'autre ; ou encore, une synergie peut s'opérer et aggraver l'intensité de la maladie.

Dans ce chapitre de thèse, nous avons mis en évidence des variations saisonnières dans la composition de l'inoculum naturel fongique présent dans les feuilles d'hévéas malades d'un même clone, provenant d'une même plantation (**Tableau 7** et **8**, **Figures 27 à 32**). Cette variabilité est probablement la conjonction du cycle biologique des différents pathogènes, des paramètres climatiques et de la phénologie. Il faut rappeler que sur des arbres cyclés (âgés de plus de 6 ans), le début d'année (février-mars) correspond à la période de refoliation après la chute naturelle des feuilles. Les feuilles de fin d'année (octobre-décembre) sont à l'inverse des feuilles matures.

En mars, la diversité fongique des feuilles est faible. On isole essentiellement du *Colletotrichum* et du *Corynespora*. En effet, les jeunes feuilles sont plus sensibles aux attaques de pathogènes et subissent, selon le clone, une attaque exclusive ou simultanée de ces deux champignons. Les autres genres tels que *Diaporthe*, *Guignardia*, *Daldinia* et *Xylaria* sont rarement isolés juste après la refoliation de l'hévéa en début d'année, alors qu'en octobre-décembre ils sont présents fréquemment dans les feuilles matures ayant échappées à la défoliation. Il semblerait donc que *Colletotrichum* et *Corynespora* soient les principaux responsables des symptômes observés sur les plantations africaines. Les autres genres sont probablement des opportunistes et, même si certains sont pathogènes sur d'autres plantes hôtes, aucune étude n'a démontré leur implication dans la symptomatologie chez l'hévéa. Des espèces du genre *Diaporthe* par exemple (dont la forme asexuée est *Phomopsis*) sont décrites comme endophytes, saprophytes mais aussi pathogènes de certaines plantes d'intérêt agronomique telles que le tournesol, la pêche, le soja ou la vigne (Udayanga *et al.*, 2011). Dans notre étude, elles ont été peu retrouvées dans les feuilles saines mais représentent le troisième genre majoritaire isolé à partir de nécroses, suggérant un mode de vie saprophyte. Il est très courant que les endophytes deviennent saprophytes lors de la senescence foliaire (Promputtha *et al.*, 2007 and 2010; U'Ren and Arnold, 2016; Porras-Alfaro and Bayman, 2011). *Diaporthe* aurait donc pu profiter de la dégradation des tissus causés par *Colletotrichum* ou *Corynespora* pour se développer (opportuniste).

Le diagnostic moléculaire par qPCR apporte l'aspect quantitatif qui manque à l'isolement mycélien (**Figures 29 à 32**) et pourra permettre d'étudier comparativement les cycles épidémiologiques des deux genres fongiques (*Corynespora* vs *Colletotrichum*). Il s'est avéré sensible, efficace, rapide et simple à mettre en place. Il permet de mieux interpréter les symptômes en différenciant ceux révélateurs d'une attaque récente, liée à la CLF ou à l'antracnose, et ceux résultant d'attaques plus anciennes n'ayant pas suffi à provoquer la chute

des jeunes feuilles. Le genre *Colletotrichum* présente une très grande diversité avec au moins trois complexes d'espèces identifiées dans nos échantillons ivoiriens, que nous pouvons maintenant diagnostiquer avec trois couples d'amorces spécifiques. D'autres études récentes ont mis en évidence la grande diversité du genre *Colletotrichum* sur hévéa en chine (Liu *et al.*, 2018). La dynamique des maladies anthracnose et CLF dans des plantations d'hévéas en Inde (clone RR1105) a été décrite par Manju *et al.* (2014), sur la base d'observations visuelles, et sans distinction d'espèces au sein du genre *Colletotrichum* (Figure 36). Ils ont montré que des souches de *C. cassicola* et de *Colletotrichum* étaient présentes toutes l'année mais que l'intensité variait selon la période de l'année. D'après cette étude, le développement optimal de la maladie CLF se situerait entre mars et mai, avec une intensité maximale en avril. Alors que le développement de l'anthracnose aurait une plus grande amplitude et se situerait entre mai et novembre avec un pic en août. Nos travaux (diagnostic moléculaire par qPCR) ont montré des résultats similaires pour *C. cassicola* mais un peu différents pour *Colletotrichum*. Pour ce dernier, nous avons observé des variations saisonnières selon le complexe d'espèce : le groupe 3 était majoritaire en mars (Figures 29, 30 et 31) et le groupe 1 était dominant en novembre (Figure 32). Cependant, les souches appartenant à ces deux groupes n'ont pas été isolées à partir des mêmes clones (RR1105, RR1102 et IRCA18 pour le Gr3 ; GT1 pour le Gr1), ce qui pourrait biaiser les interprétations. Il faudrait davantage de clones pour conclure.

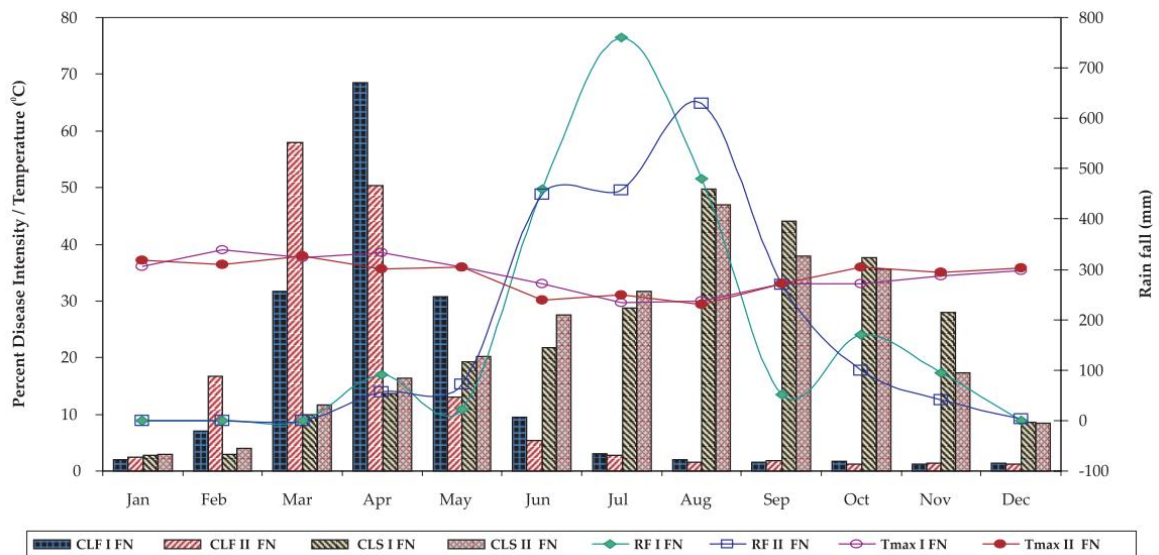


Figure 36 – Sévérité des maladies CLF et anthracnose (CLS) en fonction de la température maximale moyenne mensuelle et des précipitations, au cours de l'année 2009

La sévérité des maladies CLF (*Corynespora* Leaf Fall) et anthracnose (ou CLS pour *Colletotrichum* Leaf Spot) a été enregistrée chez l'hévéa (clone RR1105) sur la base d'observations visuelles à des intervalles de deux semaines (FN pour Fortnight). La température maximale moyenne (Tmax) et les précipitations (RN pour Rainfall) ont également été renseignées tous les quinze jours.

4.2. Typologie de la population de *C. cassiicola* en Afrique de l'Ouest

En complément de notre première collection de souches de *C. cassiicola* (Déon *et al.*, 2014), nos travaux d'isolement ont permis de constituer une collection de 128 souches de *C. cassiicola* provenant de plantations d'hévéas d'Afrique de l'Ouest (notamment de Côte d'Ivoire).

En Afrique de l'Ouest, la diversité des souches de *C. cassiicola* retrouvées sur des feuilles d'hévéa présentant des symptômes est dominée par les souches A/Cas0 (36%), suivi par les souches porteuses du gène *Cas1* (types C/Cas1 et A/Cas1) qui représentent au total un quart de la population de *C. cassiicola* (Figure 33 et 34). Les isoformes de cassiicoline Cas1 et Cas5 semblent exclusivement associées à l'hévéa (à l'exception d'une souche ivoirienne de classe Cas5 trouvée sur papaye). On observe cependant une préférence géographique, Cas1 étant présente presque exclusivement en Afrique (sauf pour CCP provenant des Philippines) alors que Cas5 est présente en abondance sur des plantations d'hévéa asiatiques, notamment en Malaisie (Shuib *et al.*, 2015). Les autres isoformes peuvent être retrouvées chez l'hévéa (Cas2) mais aussi chez d'autres plantes hôtes telles que le concombre au Brésil (Cas2, Cas2+6 et Cas2+7) et en Chine (Cas2), le soja au Brésil (Cas2+6), ou bien encore associées à des souches provenant principalement de matériel végétal sain (Cas3 et Cas4 sur hévéa et sur papaye). De plus, le gène *Cas1* est toujours associé aux souches isolées à partir de feuilles d'hévéa malades, en particulier celles des clones RRIM802, RRIM921 et IRCA18 qui sont avérés sensibles en plantation. Très récemment d'ailleurs (décembre 2017), des parcelles entières de RRIM802 et RRIM921 ont été arrachées, et des arbres du clone IRCA18 nécessitent également des arrachages ou des traitements antifongiques réguliers. Tous ces arguments suggèrent que les souches porteuses du gène *Cas1* contribuent de manière importante aux symptômes foliaires observés sur hévéa en Afrique de l'Ouest.

D'après notre étude, le clade A est le clade majoritaire au sein de l'espèce *C. cassiicola*, en Asie comme en Afrique. Il regroupe principalement des souches de types A/Cas0, dont certaines se sont avérées pathogènes mais d'agressivité moyenne (Déon *et al.*, 2014). L'identification récente dans ce clade de souches possédant la cassiicoline Cas1 est inquiétante. Il est possible que l'acquisition du gène *Cas1* se soit faite par transfert horizontal, défini comme l'échange et l'intégration stable de matériel génétique entre différents isolats ou espèces (Doolittle, 1999). Aucune forme sexuée du champignon n'ayant été identifiée pour le moment, ce genre de mécanisme constitue peut-être un moyen rapide d'acquérir de nouveaux effecteurs de virulence. Il existe de nombreux exemples de transferts horizontaux dans le règne fongique, entre espèces mais également entre souches d'une même espèce. Par exemple, le gène codant la toxine ToxA, initialement présent chez *Stagonospora nodorum*, a été acquis récemment par *Pyrenophora tritici-repentis* par transfert horizontal (Friesen *et al.*, 2006). Ces deux champignons sont associés à des

maladies foliaires du blé. Pourtant identifié en premier chez *S. nodurum*, le gène *ToxA* n'est rencontré que dans 24% de la population de ce champignon, alors qu'il est détecté dans le génome de 80% des souches de *P. tritici-repentis* (Ali and Francl, 2002; Lamari *et al.*, 1998). Un autre exemple de transfert horizontal concerne l'espèce *Fusarium oxysporum* (Ma *et al.*, 2010). Il a été montré que le chromosome 14 pouvait être transféré entre plusieurs isolats de ce champignon, transformant les souches non pathogènes en souches pathogènes. Dans notre étude, il serait intéressant de comparer la virulence des souches C/Cas1 et A/Cas1 sur différents clones d'hévéa, afin de vérifier si la virulence en interaction avec l'hévéa est corrélée ou non au niveau d'expression du gène *Cas1*.

En conclusion, nous avons montré que les souches Cas1 constituent une part importante de l'inoculum pathogène sur hévéa en Afrique de l'Ouest. Mais est-ce vraiment Cas1 qui détermine la virulence de la souche sur les clones sensibles, ou bien d'autres effecteurs produits par ces souches sont-ils également impliqués ? Avant de baser un programme de sélection sur la sensibilité à Cas1, il est nécessaire de répondre à ces questions. C'est l'objectif du Chapitre 2.

CHAPITRE 2

Etude d'un mutant de délétion du gène *Cas1*

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis au journal *Fungal Genetics and Biology* depuis le 25 septembre 2018 et accepté en mai 2019.

Contexte

Corynespora cassiicola est un champignon Ascomycète causant des dégâts importants chez une large gamme de plantes hôtes, dont l'hévéa. La cassiicoline, petite protéine sécrétée, est soupçonnée de jouer un rôle dans la virulence de *C. cassiicola* sur l'hévéa sur la base de profils de toxicité et d'expression génique. Cependant, sa contribution exacte à la virulence, comparativement à d'autres effecteurs putatifs, reste à démontrer.

Méthode

Un mutant de délétion du gène *Cas1* a été créé à partir de la souche agressive CCP. Les profils de virulence de la souche sauvage CCP et du mutant ont été comparés par des expériences d'inoculation de spores sur des feuilles de différents clones d'hévéas de sensibilité variable. La toxicité de filtrats de culture a été évaluée par des mesures de fuites d'électrolytes. Des QTL associés à la sensibilité des filtrats du sauvage et du mutant ont été analysés sur une descendance résultant d'un croisement entre le clone sensible PB260 et le clone tolérant RRIM600.

Résultats

La souche sauvage CCP et la souche mutante *ccpΔcas1* ne diffèrent pas en termes de croissance mycélienne, de sporulation et de germination. L'inoculation contrôlée sur des feuilles non détachées a révélé que la délétion du gène *Cas1* entraîne une perte totale de virulence sur les clones sensibles PB260 et IRCA631. Cependant, le mutant *ccpΔcas1* conservait une certaine virulence résiduelle lorsque l'inoculation était effectuée sur des feuilles d'hévéa détachées, notamment sur des temps d'incubation plus longs. Les symptômes ont significativement augmenté lorsque l'épiderme inférieur des feuilles a été légèrement gratté avant l'inoculation. La toxicité moyenne des filtrats, analysée sur une gamme de clone de sensibilité variable, était plus faible pour *ccpΔcas1* que pour CCP, mais n'a pas été supprimée. Deux QTL, révélés précédemment avec le filtrat CCP ou avec la cassiicoline purifiée sur la descendance PB260 x RRIM600, ont été perdus avec le filtrat du mutant, tandis que de nouveaux QTL ont été révélés. Les profils de toxicité de *ccpΔcas1* et de deux isolats Cas0 d'agressivité modérée étaient liés.

Conclusion

Nos résultats démontrent que : 1) la cassiicoline est un effecteur de nécrotrophie conférant à CCP une virulence sur des clones spécifiques d'hévéa et 2) d'autres effecteurs produits par CCP sont responsables de la toxicité du filtrat et de la virulence sur les tissus en sénescence ou blessés. Ces autres effecteurs pourraient être impliqués dans la saprotrophie plutôt que dans la nécrotrophie, permettant ainsi le développement fongique dans les tissus sénescents.

Gene deletion of *Corynespora cassiicola* cassiicolin Cas1 suppresses virulence in the rubber tree

Sébastien RIBEIRO^{1,2,3}, Dinh Minh TRAN^{2,3,4}, Marine DEON¹, André CLEMENT-DEMANGE^{2,3}, Dominique GARCIA^{2,3}, Mouman SOUMAHORO⁵, Aurélien MASSON⁶ and Valérie PUJADE-RENAUD^{1,2,3}

¹ Université Clermont Auvergne, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR PIAF, Clermont-Ferrand, France

² CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ AGAP, Université Montpellier, CIRAD, Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

⁴ Rubber Research Institute of Vietnam, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵ Société Africaine de Plantations d'Hévéas, 01 BP 1322 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

⁶ Société des Caoutchoucs de *Grand-Béréby*, *Grand Béréby*, Côte d'Ivoire

Abstract

Cassiicolin is a small secreted protein suspected to play a role in the virulence of *Corynespora cassiicola* on the rubber tree. To demonstrate its role and evaluate the possible involvement of other effectors, a deletion mutant targeting the cassiicolin gene *Cas1* was created from the highly aggressive isolate CCP. Wild-type CCP and mutant *ccpΔcas1* did not differ in terms of mycelium growth, sporulation, and germination rate. Controlled inoculation on still attached leaves revealed that *Cas1* gene deletion induced a complete loss of virulence on the susceptible clones PB260 and IRCA631. However, the mutant *ccpΔcas1* conserved some residual virulence when inoculation was conducted on detached leaves, notably with longer incubation times. Symptoms were significantly intensified when the leaf epidermis was gently scraped before inoculation. Average filtrate toxicity analyzed on a range of clones using electrolyte leakage measurements was reduced in *ccpΔcas1* compared to CCP, but not suppressed. The toxicity profile variations resulting from the *Cas1* gene deletion were clone-dependent. Both filtrates were used to phenotype the progeny of the PB260 × RRIM600 family for their sensitivity to the fungal exudates. Two QTL previously revealed with CPP or the purified cassiicolin were lost with the mutant filtrate, while new QTL were revealed. The toxicity profile of *ccpΔcas1* was related to the toxicity profile of two moderately-aggressive A4/Cas0 isolates. Our results demonstrate that: 1) cassiicolin is a necrotrophic effector conferring virulence to the CCP isolate in specific rubber clones and 2) other effectors produced by CCP are responsible for filtrate toxicity and virulence in senescing/wounded tissues. We propose that these other effectors are involved in saprotrophy, allowing fungal development in senescent tissues.

Keywords : *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, cassiicolin, deletion mutant, necrotrophic effector

1. Introduction

The **rubber tree** (*Hevea brasiliensis*) is the world's primary commercial source of **natural rubber**. In Asia and Africa, *H. brasiliensis* is affected by the *Corynespora* leaf fall (**CLF**) disease, caused by the broad-spectrum Ascomycete fungus *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. *C. cassiicola* is mostly found associated with plants, either as a **necrotrophic** pathogen or a non-pathogenic endophyte or saprophyte (Déon *et al.*, 2012b; Dixon *et al.*, 2009) has also occasionally been isolated from non-plant hosts, including humans (Huang *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2016). Since the major epidemic outbreak in Sri Lanka in 1985 (Liyanage *et al.*, 1986), reports of CLF disease have multiplied (Chanruang, 2000; Dung and Hoan, 2000; Jinji *et al.*, 2007; Manju *et al.*, 2001; Manju *et al.*, 2015; Rajalakshmi and Kothandaraman, 1996; Sinulingga and Soepena, 1996; Tan *et al.*, 1992). The pathogen is present throughout the year and affects both mature and immature leaves. Symptoms are brown leaf lesions surrounded by a yellow halo, and occasionally blackening of the veins, causing symptomatic “**fishbone**”-shaped lesions. During severe attacks, massive fall of young leaves can occur in susceptible cultivars. The physiological effort devoted to refoliation and the progressive erosion of foliar density result in a decrease of latex production over the years. Given the cost of fungicide applications, farmers often choose to uproot the most susceptible cultivars (clones) and replace them with clones displaying better tolerance. Selection programs aiming to create high yielding rubber clones with better tolerance to leaf diseases are ongoing.

Effector-assisted selection has emerged as a powerful way to select for new resistances against plant pathogens (Vleeshouwers and Oliver, 2014), especially quantitative resistances against necrotrophic fungi (Oliver *et al.*, 2014). This strategy requires previous identification of the **effectors** controlling the outcome of the interaction with the host. In the rubber tree/*C. cassiicola* pathosystem, early work identified **cassiicolin** as a potential CLF-associated effector. Cassiicolin is a phytotoxic cysteine-rich small secreted protein (SSP), counting 27 amino acids only (Breton *et al.*, 2000; de Lamotte *et al.*, 2007). This toxin was purified from the culture filtrate of **CCP**, a highly virulent strain isolated from diseased rubber tree leaves from the Philippines (Breton *et al.*, 2000; de Lamotte *et al.*, 2007; Barthe *et al.*, 2007). The purified toxin was shown to reproduce the disease symptoms with the same response profile as CCP conidia, over a range of rubber clones of variable sensitivity and a collection of different plant species (Breton *et al.*, 2000; Barthe *et al.*, 2007). Moreover, adding anti-cassiicolin antibodies into a suspension of CCP conidia before inoculation onto the leaves of a susceptible clone (PB260) caused a significant reduction in severity of symptoms compared to inoculated antibody-free controls (Breton *et al.*, 2000). Cassiicolin toxicity is host-specialized (Barthe *et al.*, 2007) and clone-dependent (Déon *et al.*, 2012a), which suggests that cassiicolin interacts, directly or not, with specific plant sensitivity

factors. Recently, we have identified two **QTL** associated with the sensitivity to both the purified cassiicolin and CCP culture filtrate, from a biparental F1 progeny (Tran *et al.*, 2016), suggesting that cassiicolin could be the main effector of CCP filtrate toxicity.

The **cassiicolin-encoding gene** (EF667973.1) was found transiently up-regulated after spore inoculation of rubber tree leaves with CCP, just before the onset of the first symptoms in the susceptible clone, suggesting a role in the early phases of infection (Déon *et al.*, 2012a). However, interaction with the plant is not strictly required for cassiicolin synthesis and secretion by CCP, as the toxin can be produced *in vitro*, in synthetic culture medium. Virulence was found to be correlated to the cassiicolin gene expression level in two strains producing strictly identical cassiicolin proteins (Déon *et al.*, 2012a).

Studies on the **genetic diversity** of *C. cassiicola* strains from various hosts and geographical origins have established a phylogeny based on the assembly of 4 concatenated loci: ITS, GA4, CAA5, and ACT (Déon *et al.*, 2014; Dixon *et al.*, 2009). We found eight major clades, named by letters (from A to H), among a collection of 70 strains. As revealed by PCR screening (Déon *et al.*, 2014), 47% of these strains carried at least one cassiicolin gene, with the existence of six distinct protein isoforms (Cas1 to Cas6). A seventh isoform was recently identified (Lopez *et al.*, 2018). We thus classified the strains into eight **toxin classes** (Cas0, Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas2+6 and Cas2+7), with Cas0 corresponding to strains for which no cassiicolin gene was detected. *C. cassiicola* strains belonging to the toxin class Cas1 appeared to be the most aggressive on two tested rubber clones (Déon *et al.*, 2014).

The **genome** of the **CCP** reference strain was recently sequenced and putative effectors identified *in silico* (Lopez *et al.*, 2018). A total of 353 genes were found to be differentially expressed during the compatible interaction of CCP with a susceptible rubber clone (PB260), among which 92 putative effectors, including cassiicolin.

Although a body of evidences suggested that Cas1 is an important effector of CCP virulence in rubber tree, its exact contribution, relatively to other putative effectors, remained unclear. Gene manipulation is a powerful method that helped characterizing several fungal effectors in various pathosystems. In *Stagonospora nodurum* for example, gene disruption of the SnTox1 or SnTox3 effectors in virulent isolates resulted in the suppression of the disease on wheat lines carrying the matching *Snn1* and *Snn3* susceptibility loci (Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). In *C. cassiicola*, homologous recombination was recently used for the functional characterization of the CCK1 MAP kinase (Liu *et al.*, 2017). This demonstrated that CCK1 is a versatile regulator of many physiological aspects such as mycelial growth and differentiation, pigmentation, conidiation or

production of secreted hydrolytic enzymes, thus indirectly influencing pathogenicity on the rubber tree. Here, we present the **functional analysis of cassiicolin** through gene deletion of the *Cas1* gene from the virulent *C. cassiicola* CCP strain. We compared the mutant and wild type strains in terms of physiology and virulence, in interaction with several rubber clones of variable susceptibility, through controlled inoculations and toxicity tests followed by QTL analysis.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The **rubber clones** (grafted from elite cultivars) used in this study were previously described by Tran *et al.* (2016). Clonal identities were checked using a set of eight microsatellite markers. Eight rubber clones (IRCA631, PB260, IRCA18, PB217, RRIC100, IRCA41, RRIM600 and GT1), chosen for their contrasted sensitivity to CLF in African plantations, were used to evaluate the virulence of the deletion mutant compared to the wild-type strain through inoculation tests. They were cultivated in a greenhouse in Clermont-Ferrand (France) at 26–28°C under controlled relative humidity (60–80%). Eighteen rubber clones (CD1174, FDR4575, FDR5240, FDR5665, FDR5788, GT1, IRCA41, MDX607, MDX624, IRCA19, IRCA303, PB217, PB254, PB260, RRIC100, RRIM901, RRIM600 and RRIM926) from the SOGB (Société des caoutchoucs de Grand Bereby) or SAPH-Toupah (Société Africaine de Plantation d'Hévéa, Toupah) plantations in the Ivory Coast were used to characterize fungal toxicity profiles using the ELM-based test (see below). Progenies from the bi-parental population PB260 x RRIM600, planted in two populations at SOGB (Pop1, 191 genotypes) and SAPH-Toupah (Pop2, 152 genotypes) were also phenotyped using the ELM-based test to identify QTL associated with sensitivity to the fungal exudates (see below).

2.2. Fungal material

Eighteen *C. cassiicola* isolates from rubber tree were used in this study (**Tableau 9**). CCP is a highly virulent strain used as reference genome for the *C. cassiicola* species (<http://genome.jgi.doe.gov/Corca1/Corca1.home.html>).

Strain typology (genetic group/toxin class) was determined according to Déon *et al.* (2014). All strains were single-conidium-purified and cultivated at 25°C in the dark on potato dextrose agar (PDA) medium (DIFCO, Detroit, MI, USA) supplemented with lactic acid (0.02%), and stored as mycelium plugs in 20% glycerol, at -80°C.

For **inoculation experiments**, conidia suspensions were prepared from 9-day-old mycelium cultures, grown for 7 days in the dark and two more days under alternate light (12-hour photoperiod) at 26°C. Conidia were collected in 5 ml sterile water and filtered through a 100 µm

pore-size cell strainer (Biologix Group Ltd, Jinan, China), to remove mycelium. Conidia were counted four times, with a hemocytometer, and diluted with water, to reach a concentration of 5, 10, 50 or 100 conidia/ μ l (depending on the experiment).

For **toxicity tests**, culture filtrates were prepared as described previously (Tran *et al.*, 2016) from 21-day-old cultures in Czapeck medium (six mycelium plugs in 100 ml, 25/26°C, 12-h photoperiod), with final sterilization through 0.20 μ m disposable filters.

Tableau 9 – *Corynespora cassiicola* isolates used in this study

<i>Corynespora cassiicola</i> strains	Geographical origin	Isolate type	Isolation year	References
CCP	Philippines	C/Cas1	2000	Breton <i>et al.</i> , 2000
CIND3	India	A4/Cas0	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CSRi5	Sri Lanka	A4/Cas0	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CLN16	Malaysia	A4/Cas0	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CCi6	Ivory Coast	A4/Cas0	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CCi13	Ivory Coast	A4/Cas0	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CSB16	Malaysia	B4/Cas5	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
TSB1	Malaysia	B4/Cas5	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CCAM3	Cameroon	C/Cas1	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CTHA3	Thailand	F1/Cas0	2012	Déon <i>et al.</i> , 2014
CCi403	Ivory Coast	A4/Cas0	2014	Unpublished
CCi434	Ivory Coast	A4/Cas0	2014	Unpublished
CCi402	Ivory Coast	A4/Cas2	2014	Unpublished
CCi449	Ivory Coast	B/Cas0	2014	Unpublished
CCi416	Ivory Coast	B/Cas5	2014	Unpublished
CCi423	Ivory Coast	I/Cas4	2014	Unpublished
CNig404	Nigeria	C/Cas1	2014	Unpublished
CCi501	Ivory Coast	C/Cas1	2015	Unpublished

2.3. Construction of the *Cas1* gene replacement cassette

The *Cas1* gene replacement cassette was generated using the double-joint PCR procedure described previously (Yu *et al.*, 2004; Guillemette *et al.*, 2011). It is composed of a selectable hygromycin resistance gene (*hph* gene under the control of the *trpC* fungal promoter, from plasmid pCB1636; Sweigard *et al.*, 1995) framed by the 5' and 3' UTR sequences of the *Cas1* gene from CCP isolate (**Figure 37**). The primers used for cassette construction are listed in **Annexe 3**. The three elements of the cassette (**Figure 37-A**) were amplified using Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After purification with a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), the three amplicons (*Cas1* 5'UTR, *hph* gene and *Cas1* 3'UTR) were mixed in a 1:3:1 molar ratio and assembled by PCR (**Figure 37-B**) using Advantage 2 Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The final construct was cloned into TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and checked by sequencing using primers P7, P8, PTrpC-F1, HygR-F3 and HygR-R1 (**Annexe 3**). The cloned cassette was re-

amplified using Phire® Hot Start II DNA Polymerase with the nested primer pair P7 and P8 (Figure 37-C), then purified (QIAquick), concentrated by ethanol precipitation to 1 µg/µl, and stored at -20°C until use.

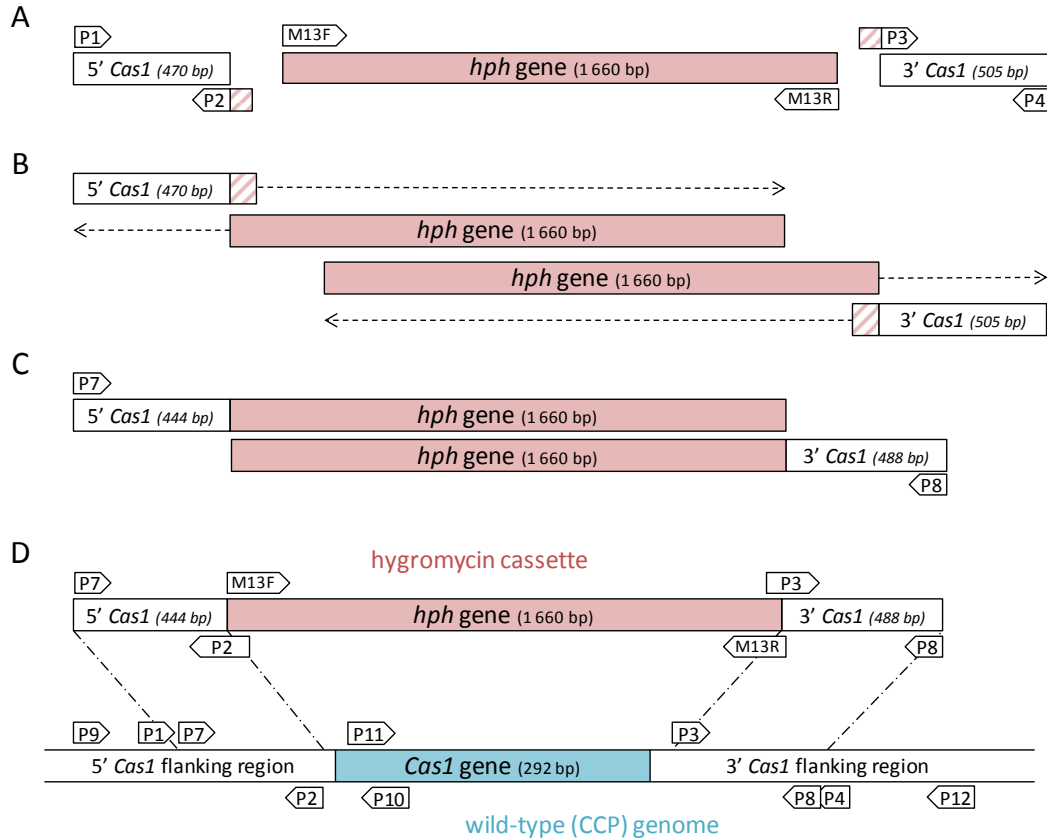


Figure 37 – Construction of the *Cas1* gene deletion cassette

Adapted from Yu *et al.* (2004). Primer details are given in Annex 2. (A) PCR amplification of the cassette elements: the hygromycin resistance gene (*hph* gene under control of the *trpC* fungal promoter) was amplified with primers M13F and M13R from the pCB1636 plasmid (Sweigard *et al.*, 1995); the 5' and 3' flanking regions of the *Cas1* gene were amplified with the primer pairs P1/P2 and P3/P4, respectively. Primers P2 and P3 carried 24 bases complementary to the ends of the *hph* gene (striped square). (B) PCR assembly of the elements, with the overhanging chimerical extensions acting as primers. (C) PCR amplification of the full deletion cassette using primers P7 and P8. (D) Replacement of the native *Cas1* gene by the hygromycin resistance gene (*hph* gene) on the CCP genome, by homologous recombination.

2.4. Transformation of *C. cassiicola* protoplasts

C. cassiicola protoplasts were prepared and transformed using procedures adapted from previous studies (Akamatsu *et al.*, 1997). A conidia suspension from the CCP strain was prepared as described above and diluted to a final concentration of approximately 1×10^5 conidia/µl in 200 ml of potato dextrose broth (PDB, PDB, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 17 h at 26°C with shaking at 175 rpm in the dark, the fungal culture was divided into four 50 ml batches and harvested by centrifugation at 5,000 g for 10 min, at room temperature. The pellets were washed

twice with 0.7 M NaCl and digested in 25 ml of enzymatic solution (0.7 M NaCl, 10 mg/ml Kitalase and 20 mg/ml Driselase) at 32°C for 3 h, with manual shaking every 30 min. The generated protoplasts were filtered through a 100-µm pore-size cell strainer (Biologix) and collected by centrifugation at 4,000 g for 5 min, at room temperature. The pellets were washed with 10 ml of 0.7 M NaCl and twice with 10 ml of STC buffer (1.2 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH7.5 and 50 mM CaCl₂). Each protoplast pellet was resuspended in 500 µl of STC buffer, adjusted to a concentration of 10⁷-10⁸ protoplasts/ml and divided into 100 µl aliquots into 12–15-ml round-bottom tubes. DNA aliquots of the *Cas1* gene replacement cassette were added to the protoplasts (10 µg per tube) in order to replace the native *Cas1* gene by the *hph* gene, by homologous recombination (**Figure 37-D**). The tubes were gently mixed by hand-rolling and incubated on ice for 20 min. PEG solution (60% w/v polyethylene glycol MW 3350–4000, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 and 50 mM CaCl₂) was added, drop by drop, in three batches (200, 200 and 800 µl, successively). Tubes were warmed and gently mixed by hand-rolling before and after each PEG addition, then incubated on ice for 5 min until the next addition. Then, the mixture was diluted with 1 ml of STC buffer. Finally, 150 µl of protoplasts were sprayed on a Petri dish containing 20 ml of still soft regeneration medium (1 M sucrose, 0.1% yeast extract, 0.1% casein hydrolysate, 1.6% agar). After 24 h incubation at 26°C, the plate was covered by 10 ml of water-agar (1%) supplemented with 10 µg/ml hygromycin B and incubated for 5 days at 32°C. As mycelium could grow massively though the selective layer, the selection was increased by successively adding two layers of PDA supplemented with 40 µg/ml then 80 µg/ml hygromycin B. The resistant mycelial colonies were transferred onto fresh PDA plates containing 20, 40 and 60 µg/ml successively of hygromycin B to confirm resistance. Transformants growing at the highest hygromycin concentration (60 µg/ml) were purified by single-conidium isolation. For further use, they were grown on PDA with 60 µg/ml hygromycin.

2.5. Verification of *Cas1* gene deletion

Mycelium was collected from **7-day-old cultures** of the hygromycin-resistant transformants or CCP wild-type controls. Genomic DNA was extracted following the MATAB protocol (Risterucci *et al.*, 2000). PCR runs were performed from 100 ng of DNA with the Phire® Hot Start DNA Polymerase, according to the supplier's instructions. Several primers were used for PCR reactions or for sequencing (**Annexe 3**): M13F, M13R, HygR-F3, HygR-R1 and PTrpC-F1 amplify the *hph* gene; P1/P4, P7/P8 and P9/P12 primer pairs amplify the flanking regions of *Cas1* gene or *hph* gene; P11 and P10 were used as internal primer to *Cas1* gene. Amplification was conducted for 35 cycles of 5 sec at 98°C, 5 sec at 60°C, 1 min at 72°C. PCR products from P9/P12 were sequenced using all the primers in **Annexe 3** (except P2 and P3) by GATC-Biotech, and aligned using Geneious Pro program v10.2.3.

2.6. *Cas1* gene expression by real-time quantitative PCR

Cas1 gene expression was investigated in germinated conidia of the wild-type and mutated CCP strains. Conidia suspensions were prepared as described above and germinated in malt extract broth (MEB, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), under continuous shaking (150 rpm), for 24h. The cultures were centrifuged at 8,000 g for 30 minutes at room temperature and the pellets were immediately frozen and ground in liquid nitrogen. Total RNA was extracted by vortexing (30 sec at full speed) in 900 µl of CTAB extraction buffer (Chang *et al.*, 1993) supplemented with 0.2 g sterile glass beads (425–600 µm, acid-washed, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples were treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega, Madison, WI, USA). Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using oligo-dT and SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR amplification was performed in a StepOne thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using 2 µl of 40-fold-diluted first-strand cDNA as template, Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Liège, Belgium) and primers listed in **Annexe 3**. The thermal profile used was: 95°C for 3 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 sec and 30 sec of annealing/extending at 60°C. Amplicon specificity was checked by melting curve analysis (95°C for 15 sec, 60°C for 1 min and an increase of 0.5°C with a hold of 15 sec to reach 95°C) and agarose gel electrophoresis. All reactions were run in triplicate. Ct values were determined by the StepOne software v2.3 with default parameters. The *Cas1* gene was amplified using the primer pair Cc-qCas1-F1/R1 (**Annexe 3**). For normalization, three *C. cassicola* reference genes (elongation factor *EF1a*, *Actin*, and β -tubulin *BTUB*) were amplified with primer pairs Cc-qEF1a-F1/R1, Cc-qActin-F1/R1 and Cc-Btub-F1/R1 respectively (**Annexe 3**). For each sample, the Excel-based tool BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) was used to calculate a Bestkeeper index, which is the geometric mean of the Ct values obtained for the three reference genes. The deviation from the mean of all BestKeeper indexes was then subtracted from the Ct value obtained with the *Cas1*-specific primers. The transcript accumulation calculation method was according to (Lopez *et al.*, 2012). A linear regression line was created after assigning an arbitrary score ranging from 0 to 100 corresponding to the highest (40) and smallest (20) *Cas1* gene Ct values, respectively. The transcript accumulations of unknown samples were then determined according to the position of their *Cas1* gene Ct values on the line.

2.7. *In vitro* analysis of sporulation and germination rates

Mycelium plugs (5 mm diameter) of either the wild-type strain CCP or the conform *Cas1*-deletion mutant *ccpΔcas1* were transferred onto the corresponding culture medium (PDA with or without 60 µg/ml hygromycin). Four plates for each condition were incubated in the dark at 26°C. Mycelium diameter was measured daily for one week in order to compare strain growth (mm/day). The same plates were used to prepare the conidia suspensions as previously described.

Conidiation, expressed in conidia/ μl , was calculated as the average of the four counts. The conidia suspensions were finally diluted to 10 conidia/ μl in sterile water and immediately plated on PDA (10 μl per plate). Percentage of germination was recorded after 24 hours of incubation in the dark at 26°C.

2.8. Virulence analysis of rubber tree leaves

Inoculation tests were performed with the wild-type and deleted CCP strains on detached and non-detached rubber tree leaves from greenhouse plants. Conidia suspensions were prepared as described above.

Test on detached leaves:

Leaves collected at developmental stage C (Hallé and Martin, 1968) were placed on wet paper in 245 × 245 mm Nunc™ bioassay dishes (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) and inoculated as previously described (Déon *et al.*, 2012a; Déon *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2016) except entirely in the dark. For each clone, five leaflets were inoculated with 6 drops (20 μl) of conidia suspension, on the abaxial surface. In a first experiment, eight rubber clones (GT1, IRCA18, IRC41, IRCA631, PB217, PB260, RRIC100 and RRIM600) were inoculated with a conidia suspension at 5 conidia/ μl . In a second experiment, conidia were applied at higher concentration (50 conidia/ μl) on the tolerant clone GT1 clone and the susceptible clones IRCA631 and PB217, under identical conditions. In a third experiment, the same three clones were inoculated at 5 conidia/ μl after gentle abrasion of the leaf epidermis at the inoculation spots. Negative controls were inoculated with water. At least four biological replicates were performed for each condition. Symptom intensity was scored by measuring necrotic area (mm^2) on photos of the leaflet taken 4 days after inoculation, using ImageJ software.

Test on non-detached leaves:

Four rubber clones (IRCA631, GT1, PB260 and RRIM600) were analysed in this experiment. In the greenhouse, full non-detached leaves at developmental stage C were enclosed in bioassay dishes equipped with wet paper (as above), suspended at the appropriate height with nylon strings, and notched on the side for the petiole. The bioassay dishes were made opaque so that incubation could be performed in the dark as in the previous experiments on detached leaves. Each leaflet was gently twisted to place the abaxial face up. Inoculation was performed with a conidial suspension at 10 conidia/ μl (20 μl per drop, six drops per leaflet). Negative controls were performed with water. All the leaflets were collected 9 days after inoculation, corresponding to the moment when the leaves of the most susceptible clone (IRCA631), inoculated with the wild-type strain, naturally dropped. At least four biological replicates per condition were performed. Necrotic area (mm^2) was measured from photos of the leaflets taken 9 days after inoculation, using ImageJ software.

2.9. Complementation with exogenous cassiicolin

To confirm the role of cassiicolin in virulence, the deletion mutant was **complemented with exogenous cassiicolin**. CCP and *ccpΔcas1* mycelial growth rates were compared in interaction with the susceptible rubber clone IRCA631, by absolute qPCR, in presence or absence of exogenous cassiicolin. Conidia suspensions were prepared as described above and calibrated at 5 conidia/μl. Cassiicolin was purified from CCP culture filtrate as described previously (Tran *et al.*, 2016). Conidia suspensions (20 μl), complemented or not with 10 μl of cassiicolin at 5 ng/μl (Tox5), were applied on detached leaves after gentle abrasion of the leaf epidermis to allow penetration and action of the toxin. Negative controls were water with or without toxin, applied also after abrasion. Four biological repeats were performed for each condition. After four days in the dark at 26°C, three leaf disks (2.2 cm²) per leaflet were sampled at the inoculation points and immediately frozen and ground in liquid nitrogen. Genomic DNA was extracted following the MATAB protocol (Risterucci *et al.*, 2000) and treated with 10 mg/mL of RNase A (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The standard curve method was used to determine the absolute quantity of the *C. cassiicola* *β-tubulin* gene (**Annexe 3**) from 200 ng of CCP or *ccpΔcas1* DNA, using a StepOne thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). qPCR amplification was performed as described above. Standard curve was generated by plotting the values of known quantities of CCP mycelial serially diluted DNA (100, 20, 4, 0.8 and 0.16 ng) on the corresponding Ct values. Ct values of unknown treated-foliar samples were projected on this created standard curve, thus giving the quantity of target genomic DNA.

2.10. ELM-based toxicity test

A **phenotyping test** based on **electrolyte leakage measurements** (ELM) was used to assess the sensitivity of rubber clones to *C. cassiicola* exudates, as described previously (Tran *et al.*, 2016). The test was used in two experiments: on the 18 selected clones described and on 343 genotypes from the bi-parental population PB260 x RRIM600 (Tran *et al.*, 2016). Treatments were filtrates from 21-day-old cultures of various *C. cassiicola* isolates (**Tableau 9**) including CCP and the deletion mutant *ccpΔcas1*, purified cassiicolin Cas1 at different concentrations (1, 5 and 10 ng/μl), and blank treatments (water and Czapeck culture medium). Leaves were collected at morphogenetic stage C (Hallé and Martin, 1968) and inoculated in vitro with two drops (15 μl each) of each treatment solution applied on the abaxial surface of each leaflet after local abrasion of the lower epidermis (1 mm²). After 48h in the dark at 26°C, two leaf disks (2.2 cm²) per leaflet were sampled at the inoculation point. They were soaked in 5 ml of autoclaved distilled water, in glass tubes, for 24 h, in the dark, at 26°C. Conductivity of the solution was measured as described previously (Tran *et al.*, 2016), before (C1) and after (C2) autoclaving. Percentage of electrolyte

leakage (EL%) induced by each treatment was calculated as $(C1/C2) \times 100$. At least three biological replicates were performed for each clone/treatment combination.

QTL associated with sensitivity to fungal exudates were analyzed as previously described (Tran *et al.*, 2016), from the %FE values measured using the ELM-based test on 343 genotypes from the PB260 × RRIM600 family treated with the purified cassiicolin at 5 µg/ml (Tox5) or with culture filtrates from various *C. cassiicola* isolates, including the wild-type and mutated CCP. QTL were calculated by the Interval Mapping method using MapQTL6 software (van Ooijen and Kyazma, 2009). They were considered significant at the LoD threshold of 4.2 ($\alpha=0.05$).

2.11. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R Studio (Version 1.1.383). A Student's *t*-test was used to compare size, conidiation and germination of wild-type and mutant strains. Analysis of variance (ANOVA) was followed by Tukey's HSD (growth kinetics and virulence tests) or SNK (ELM-based toxicity test) post hoc analysis (at risk $\alpha = 0.05$). The Welch correction was applied when appropriate. All other analyses were performed with a non-parametric Kruskal-Wallis test. A heatmap was generated with the %FE value matrix data of the clone × treatment combination using the heatmap.2 function from the gplots package. Double hierarchical clustering of rows and columns in the heatmap was based on Euclidean distances and used Ward's method of clustering ("ward.D2" in the hclust function).

3. Results

3.1. *Cas1* deletion in *Corynespora cassiicola* strain CCP

In order to indisputably settle the **role of cassiicolin Cas1** in *Corynespora cassiicola* pathogenicity in the rubber tree, a **deletion mutant** was created from the virulent CCP isolate by replacing the *Cas1* gene with a hygromycin resistance cassette. The deletion construct consisted of the hygromycin phosphotransferase gene (*hph*) framed by *Cas1* 5' and 3' flanking regions, to drive homologous recombination with the native *Cas1* gene (**Figure 37**).

Eight hygromycin-resistant transformants were selected on PDA medium supplemented with hygromycin B (60 µg/ml). Conformity was checked by PCR comparatively to the wild-type CCP strain (**Figure 38**), using primers listed in **Annexe 3**. Successful integration of the hygromycin resistance cassette in all 8 transformants was confirmed using primers M13F and M13R, internal to the resistance cassette. To verify the integration site, amplifications were performed with primer P1, targeting the *Cas1* 5' flanking region upstream of the cassette integration site, and primer M13R. A product of expected size was obtained for recombined strains 1, 6, 7 and 8,

indicating that the cassette was integrated at the proper *CasI* locus. No amplification was obtained for strains 2, 3, 4 and 5. With primers P1 and P4 (external to the deletion construct) that can amplify both the native (1,300 bp) and recombinant (2,635 bp) *CasI* locus, three amplification profiles were obtained. For strains 2, 3, 4 and 5, a single band corresponding to the native gene was obtained, thus confirming that the cassette was mistargeted. In strains 1, 7 and 8, both native gene and deletion cassette were amplified, suggesting that the cassette failed to delete the *CasI* gene even though it was integrated at the proper locus. In addition, a third band (above 3,000 bp) was observed in these strains, which may correspond to the fusion of the native gene and replacement cassette. Only **transformant 6** had the expected profile, i.e. a single amplification product corresponding to the hygromycin resistance gene, without any product corresponding to the native gene. Amplification using primers P11 (in *CasI* CDS) and P4 (in *CasI* 3' flanking region) confirmed the persistence of the native *CasI* gene in all strains except transformant 6. Finally, sequence conformity of transformant 6 was verified by sequencing the P9/P12 amplicon on both strands.

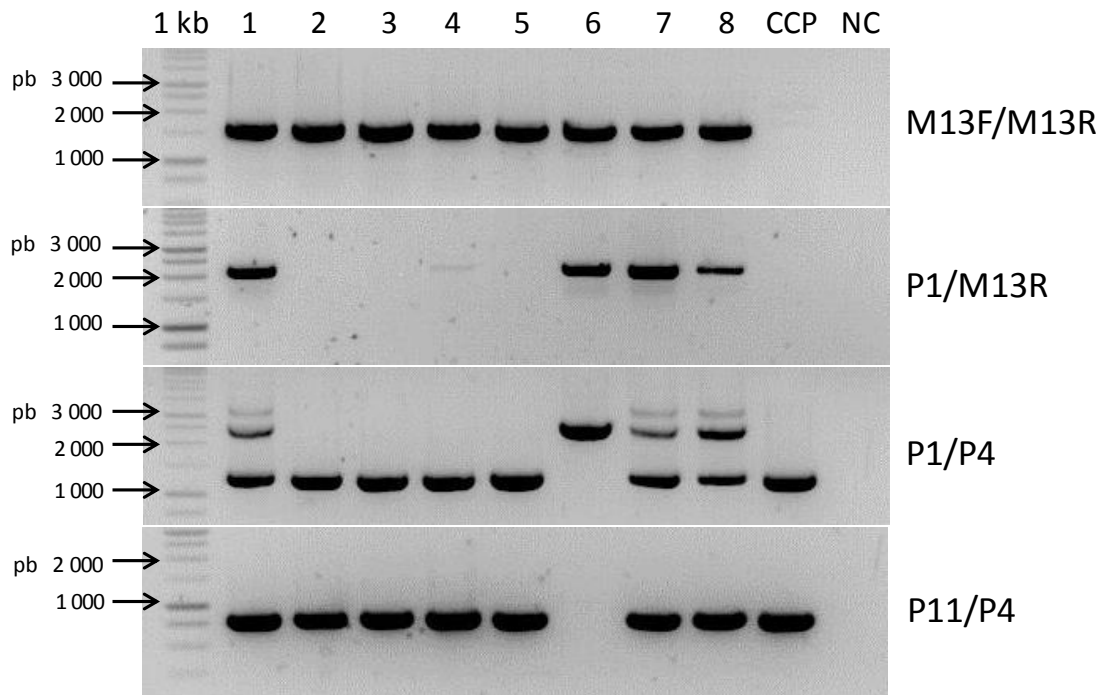


Figure 38 – PCR analysis of the hygromycin-resistant transformants

PCR amplification from genomic DNA of 8 hygromycin-resistant transformants (lanes 1 to 8) and the wild-type (lane CCP) using 4 primer pairs (M13F/M13R, P1/M13R, P1/P4 and P11/P4). A negative control was performed using water (lane NC). Pair M13F/M13R amplifies the hygromycin cassette (1,660 bp). P1/M13R was used to verify the cassette insertion site (2,133 bp). P1 and P4, located in *CasI* flanking regions, external to the [P7-P8] deletion cassette, amplified the native *CasI* gene (1,300 bp) and/or the deletion cassette (2,638 bp). P11/P4 identifies the native *CasI* gene only (795 bp). PCR products were separated on 1% agarose gels by electrophoresis in 0.5X TAE buffer supplemented with Sybr Safe (0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), and photographed under UV light. 1 kb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA) was used as molecular-weight size marker (first column).

3.2. *Cas1* gene expression in CCP wild-type and transformant strains

We finally **verified** the **deletion** by analyzing *Cas1* gene expression in five transformants representing the three insertional profiles described in **Figure 38**: transformants 1 and 8 carrying both native *Cas1* and the replacement cassette at the proper (*Cas1*) locus; transformants 4 and 5 carrying both native *Cas1* and the replacement cassette at a wrong locus; and transformant 6 with *Cas1* gene fully replaced by the cassette. Expression was analyzed in germinated conidia. The highest expressions were measured in wild-type CCP and transformants 4 and 5, without significant differences (**Figure 39-A**). Native *Cas1* gene seems to be completely functional in these two transformants. Conversely, transcripts accumulation was significantly lower in transformants 1 and 8, indicating that *Cas1* gene expression in these strains was negatively impacted—but not totally suppressed—by the hygromycin cassette insertion. Finally, no *Cas1* expression was detected in transformant 6 while the reference gene was normally expressed (**Figure 39-B**). The conform *Cas1* gene deletion mutant (transformant 6) was renamed *ccpΔcas1*.

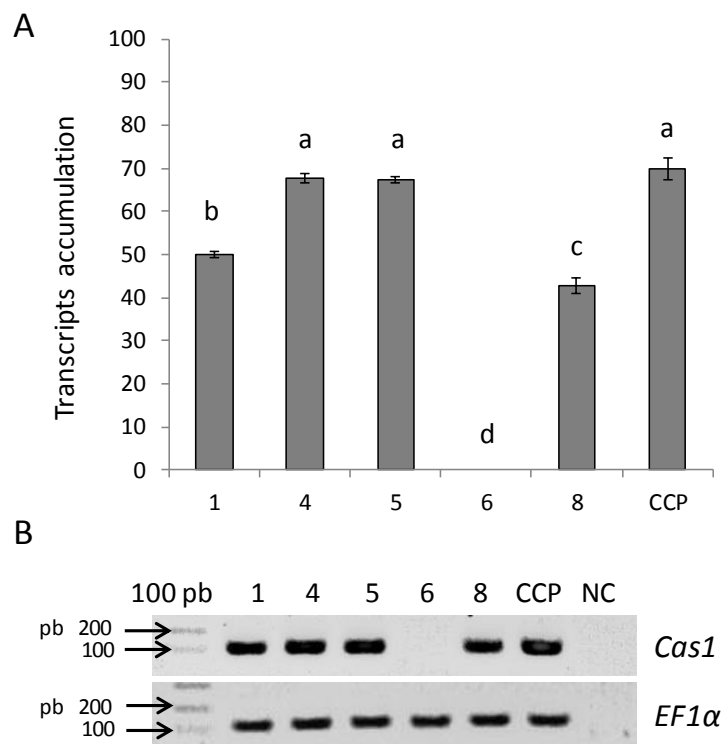


Figure 39 – Detection of *Cas1* cDNA on 24-hr germinating spores of CCP and transformants 1, 4, 5, 6, 8

(A) Real-time quantitative PCR analysis of *Cas1* gene transcript accumulation. Normalization was performed using three reference genes from *Corynespora cassiicola*: *EF1α*, *Actin* and *βTUB* (Table 2). Error bars represent standard error of the mean for at least three biological replicates. Data were analyzed using a Kruskal-Wallis test. Groups with the same letters are not significantly different ($P < 0.05$).

(B) Agarose gel electrophoresis (1%) of the real-time quantitative PCR products from *Cas1* (top) and *EF1α* (bottom) gene in 0.5X TAE buffer supplemented by Sybr Safe ($0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), photographed under UV light. Purified water was used as negative control (NC). 100-bp DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA) was used as molecular-weight size marker (first column).

3.3. Physiological comparison of CCP and *ccpΔcas1*

Wild-type CCP and mutant *ccpΔcas1* were compared *in vitro* in terms of mycelium growth, conidiation and germination (Figure 40 and Tableau 10). Colony diameter of both strains was measured daily for 7 days on PDA medium supplemented or not with hygromycin. CCP and *ccpΔcas1* grew at the same speed, with an increase of 8 mm/day in average, on PDA and PDA supplemented with hygromycin, respectively (Figure 40-A). Growth of the mutant was not affected by the antibiotic (not shown). After 7 days, mycelium filled the entire Petri dish surface. The young mycelium appeared darker in the wild-type compared to the mutant (Figure 40-B) and this difference persisted in older mycelium (> 7 days). However, this color difference may be explained by the presence of hygromycin in the mutant culture medium rather than the absence of *Cas1* gene. Conidiation and percentage of germination after 24 h were statistically similar between CCP and *ccpΔcas1* (Tableau 10).

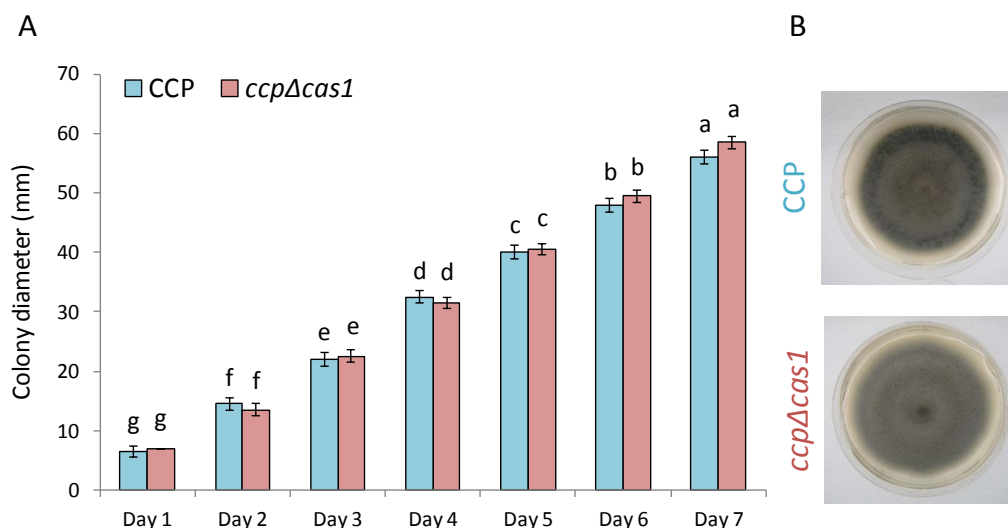


Figure 40 – Comparison of mycelium size and shape of CCP and *ccpΔcas1* strains

The mycelium from the CCP strain was cultivated on PDA medium supplemented with lactic acid (0.02%). The *ccpΔcas1* mutant was cultivated on PDA medium supplemented with lactic acid (0.02%) and hygromycin B (60 $\mu\text{g/mL}$). Both strains were incubated in the dark at 26°C. Diameters of mycelia were measured daily during 7 days (A), then photographed (B). Size of the initial mycelial plug (5 mm) was subtracted such that all measurements began at 0 mm. Data were analyzed using ANOVA. Letters indicate the significance of between-group differences (Tuckey's HSD test, $\alpha=0.05$).

Tableau 10 – *In vitro* comparison of mycelial growth, conidiation and germination rates between CCP and *ccpΔcas1*

Strain	Colony diameter of seven days-old cultures (mm)	Conidiation (conidia/ μl)	Germination (%)
CCP	56 \pm 1,2 a	426 \pm 56 a	72 \pm 9 a
<i>ccpΔcas1</i>	58 \pm 1,0 a	479 \pm 42 a	70 \pm 6 a

Data are given as means of four independent replicates plus standard deviation. Statistical analysis used a Student's *t*-test. Letters indicate the significance of between-group differences (Student's *t*-test, $\alpha=0.05$).

3.4. Pathogenicity of *ccpΔcas1* mutant on detached rubber tree leaves

CCP and *ccpΔcas1* strains were compared for their virulence on eight rubber clones with contrasted sensitivities, by analyzing the extent of symptoms induced 4 days after application of a conidial suspension (5 conidia/ μ l) on detached rubber tree leaves (Figure 41 and Annexe 5). As shown previously (Tran *et al.*, 2016), CCP induced a gradient of symptoms on these clones. Four clones (IRCA631, PB260, IRCA18 and PB217) could be considered as susceptible to CCP isolate, with IRCA631 significantly more susceptible than the others. The other four (RRIC100, IRCA41, RRIM600 and GT1) showed an average necrosis area lower than 5 mm² (or no symptoms at all in case of GT1), without significant differences between clones or compared to water-treated controls (Annexe 5). They could thus be considered as tolerant to CCP, in good agreement with previous results (Tran *et al.*, 2016). Mutant *ccpΔcas1* induced very low symptoms whatever the clone (average necrosis area below 1 mm²), at levels comparable to those induced by wild-type CCP on the tolerant clones or by control treatment (Annexe 5).

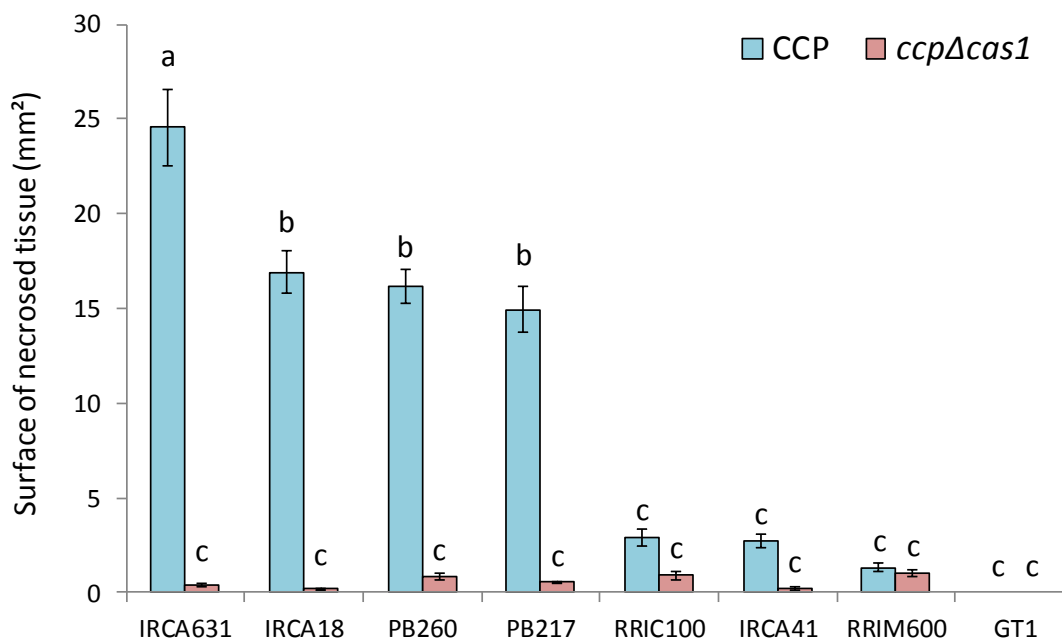


Figure 41 – Virulence of mutant *ccpΔcas1* and wild-type CCP on detached leaves from 8 rubber clones

For each clone, 5 leaves were each treated with 6 drops of conidia suspension at 5,000 conidia/ml from either CCP or *ccpΔcas1*. For each strain/clone combination, symptom intensity was scored four days after spore inoculation as the mean surface of necrotic tissue (mm²), for at least four biological replicates. Water-treated controls did not induce any symptoms (Annexe 5). Data were analyzed using Welch's ANOVA. Letters indicate the significance of between-group differences (Tuckey's HSD test, $\alpha=0.05$).

To confirm the loss of virulence in mutant *ccpΔcas1* compared to wild-type CCP, inoculation was repeated with a ten-fold **higher concentration of conidia (50 conidia/μl)** on detached leaves from three contrasted clones IRCA631 (highly susceptible), PB217 (susceptible) and GT1 (tolerant), incubated for up to 7 days post-inoculation (**Figure 42** and **Annexe 5**). At 4 days post-inoculation (dpi), the ten-fold increase in CCP conidia concentration induced a three and five-fold symptom increase on the susceptible clones (IRCA631 and PB217), respectively, but no increase on the tolerant clone GT1 which remained symptomless. Symptoms induced by the *ccpΔcas1* mutant at such high conidia concentration remained very low although significantly different compared to the water-treated controls on susceptible clones. With longer incubation (7 dpi), symptoms were increased significantly whatever the clone, with either CCP or *ccpΔcas1*. Nevertheless, the symptoms induced by the mutant remained much lower than those induced by CCP on the susceptible clones, and identical to symptoms on the tolerant clone. While it appeared completely healthy at 4 dpi, the tolerant clone GT1 displayed low but significant symptoms at 7 dpi compared to the still healthy water-treated control leaves.

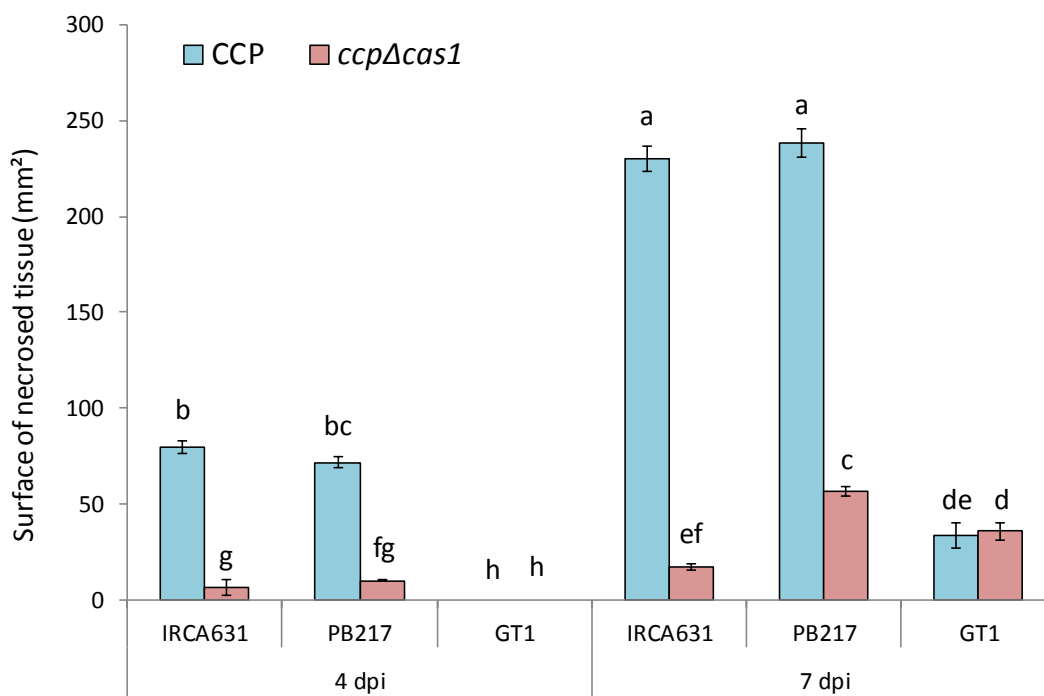


Figure 42 – Effect of spore concentration on CCP and *ccpΔcas1* virulence on detached rubber tree leaves

Detached leaves of the susceptible (IRCA631 and PB217) and tolerant (GT1) rubber clones were inoculated with CCP or *ccpΔcas1* conidial suspension at 50 conidia/μl. For each clone, four leaves were each treated with 6 drops of conidial suspension. After four or seven days post-inoculation (dpi), surface of necrotic tissue (mm²) was measured around each drop. Data are means of at least four biological replicates. Water-treated controls did not induce any symptoms (**Annexe 5**). Letters indicate the significance of the between-group differences (Kruskal-Wallis test, $\alpha=0.05$).

A third experiment (**Figure 43** and **Annexe 5**) was conducted on detached leaves of three contrasted clones (IRCA631, PB217, GT1) with 5 conidia/ μl and observations at 4 dpi, as in **Figure 41**, except that we gently **scraped the leaf epidermis** before applying the conidia suspension. In this experiment, scraping was intended to overcome the cuticle barrier, but it also induced a local wounding effect, in addition to the effect triggered by leaf excision. On the susceptible clones (IRCA631 and PB217), scraping strongly increased the intensity of CCP-induced symptoms. There was also a moderate scraping effect on leaves inoculated with *ccp Δ cas1*. The mutant *ccp Δ cas1* inoculated after scraping can be considered as virulent since it induced symptoms of similar intensity to those induced by CCP without scraping. However, it remained far less aggressive than CCP when both were applied on scraped leaves of the susceptible clones. Symptoms induced on the tolerant clone GT1 remained low and statistically identical for both strains. Scraped leaves inoculated with water remained symptomless whatever the clone (**Annexe 5**).

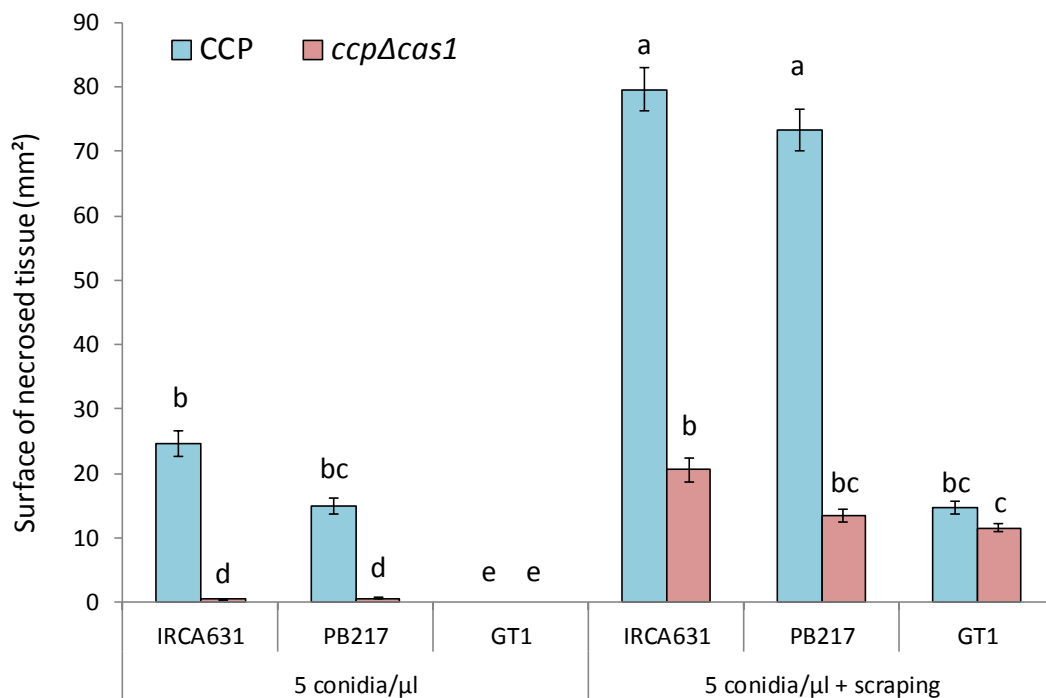


Figure 43 – Effect of leaf scraping on CCP and *ccp Δ cas1* virulence on detached rubber tree leaves

Detached leaves of the susceptible (IRCA631 and PB217) and tolerant (GT1) rubber clones were inoculated with CCP or *ccp Δ cas1* conidial suspension at 5 conidia/ μl , with (right) or without (left) gentle scraping of the lower epidermis. For each condition, four leaves were each treated with 6 drops of conidia suspension. After four days, the surface of necrotized tissue (mm²) was measured around each drop. Data are means of at least four biological replicates. Water-treated controls did not induce any symptoms (**Annexe 5**). Letters indicate the significance of between-group differences (Kruskal-Wallis test, $\alpha=0.05$).

3.5. Pathogenicity of *ccpΔcas1* mutant on non-detached leaves

We finally set up an assay allowing controlled inoculation **without excision of the leaves** while keeping conditions as close as possible to the above-described assay on detached leaves (inoculation with drops of conidia suspension on leaves maintained in plastic boxes under maximal humidity). This assay (**Figure 44** and **Annexe 5**) allowed delayed observation (up to 9 dpi) without senescence effects triggered by leaf excision. Four clones (IRCA631, PB260, RRIM600 and GT1) were inoculated with both strains. Nine days after inoculation, the leaves from IRCA631 inoculated with CCP were severely damaged, and abscission naturally occurred. All the other treated leaves (conidia-inoculated or water-treated leaves) from all four clones were then manually detached for comparative analysis at the same timepoint. Leaves from the susceptible clones IRCA631 and PB260 inoculated with wild-type CCP were severely damaged, with IRCA631 more susceptible than PB260, as observed in the detached leaves assay (**Figure 41**). The tolerant clones RRIM600 and GT1 showed no significant symptoms in response to CCP compared to control (water) treatment. Strikingly, no symptom was observed on the leaves inoculated with *ccpΔcas1*, whatever the clone, except for a few pinpoint symptoms on IRCA631 that were not statistically significant compared to those induced by the control treatment or by CCP on the tolerant clones.

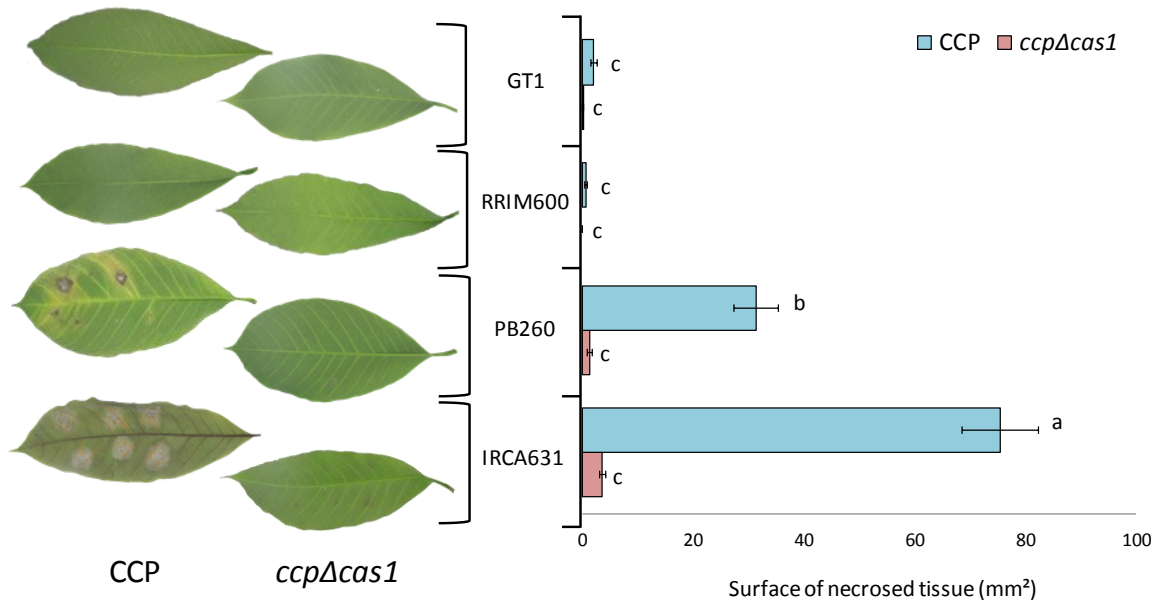


Figure 44 – Virulence of CCP and *ccpΔcas1* on non-detached rubber tree leaves

Leaves of 4 rubber clones (IRCA631, PB260, RRIM600 and GT1) were inoculated with wild-type (CCP) and mutant (*ccpΔcas1*) strains while still attached to the tree. For each clone, three leaves were each treated with 6 drops of conidia suspension at 10,000 conidia/ml from either CCP or *ccpΔcas1*. For each strain/clone combination, pictures of leaf symptoms were taken 9 days after spore inoculation. Pathogenicity was scored by analyzing extent of symptoms as the mean surface of necrotic tissue (mm²) for 4 biological replicates. Water-treated controls did not induce any symptoms (**Annexe 5**). Data were analyzed using Welch's ANOVA. Letters indicate the significance of between-group differences (Kruskal-Wallis test, $\alpha=0.05$).

3.6. Complementation of *ccpΔcas1* with purified cassiicolin

The previous inoculation experiments demonstrated the significant loss of virulence of *ccpΔcas1* compared to the wild-type CCP, in several rubber clones, suggesting that cassiicolin is required for virulence in these clones. To rule out any functional defect of the fungus due to either a spontaneous mutation or ectopic insertion of another copy of the deletion cassette in the fungal genome, we conducted a **complementation experiment** with exogenous cassiicolin: we inoculated both strains on the susceptible clone IRCA631, with or without previous application of purified cassiicolin at 5 ng/μl (Tox5), on abraded leaves. It should be underlined that gentle abrasion of the epidermis before application of the toxin is required for toxin action (**Figure 45**). We then monitored the mycelial development in the leaf tissues after four days, by absolute qPCR, with primers targeting the *C. cassiicola* housekeeping *β-tubulin* gene. (**Figure 46**). The absence of amplification in the control leaves (treated with water or water+Tox5) confirms the specificity of the primers for the fungal *β-tubulin* gene. A low amount of DNA was detected for *ccpΔcas1* without cassiicolin, but it was found not significant compared to the controls, suggesting that the mutant is blocked soon after inoculation or that its development is very slow. In the presence of cassiicolin (*ccpΔcas1*+Tox5), the growth of the mutant was six-fold higher and statistically identical to that of the wild-type CCP. Exogenous cassiicolin had no additive effect on CCP growth, suggesting that the production of endogenous cassiicolin by CCP was sufficient to allow optimal development of the fungus in the plant tissues. To conclude, complementation with exogenous cassiicolin restored the mutant capacity to develop rapidly inside the rubber leaves.

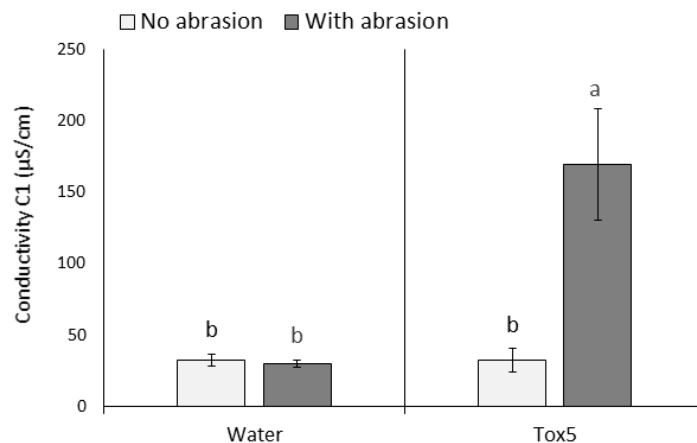


Figure 45 – Toxicity of purified cassiicolin Cas1 on a susceptible clone, with or without previous abrasion of the leaves.

Detached leaves of the susceptible rubber clone PB260 were treated with purified cassiicolin at 5 ng/μl (Tox5) or sterile water (control). The treatments (2 drops of 10 μl per leaflet) were applied on the abaxial face of the leaf, with (dark grey) or without (light grey) local abrasion of the epidermis. Phytotoxicity was assessed two or nine days after treatment, by conductivity measurement of the induced electrolyte leakage (C1, in μS/cm). For each condition, three biological repeats were performed. Letters indicate the significance of between-group differences (Kruskal-Wallis test, $\alpha=0.05$).

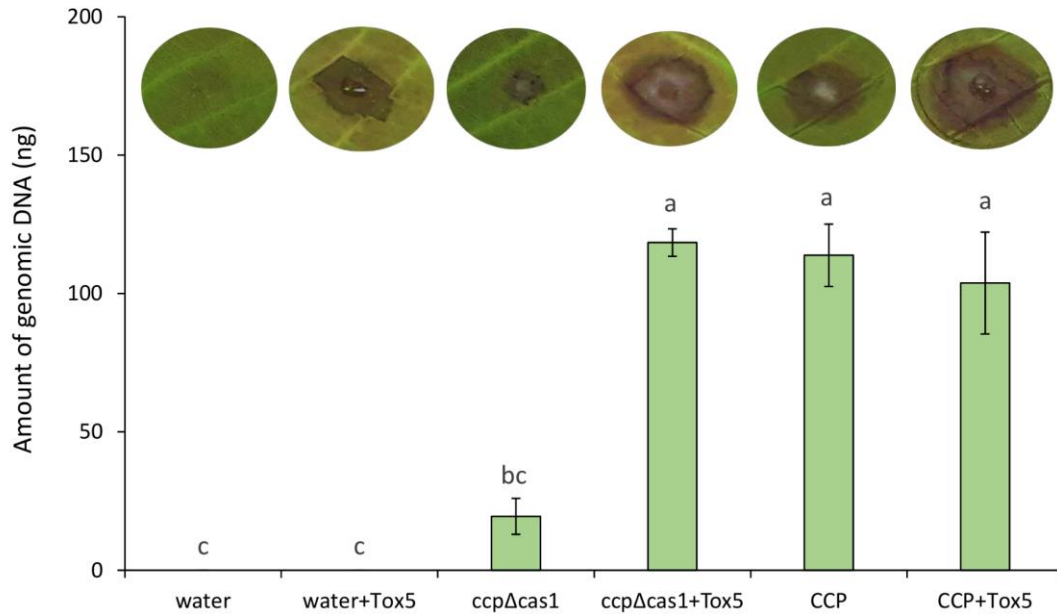


Figure 46 – Quantification of CCP and *ccpΔcas1* fungal mass by qPCR in leaves of IRCA631 rubber clone supplemented or not with the purified cassiicolin.

Detached leaves of the susceptible IRCA631 rubber clone were treated, after a gentle abrasion of the lower epidermis, with 20 μ l of water or with a conidial suspension from CCP or *ccpΔcas1* (5 conidia/ μ l), added or not by 10 μ l of the purified cassiicolin at 5 ng/ μ l (Tox5). After four days in the dark at 26°C, three leaf disks (2.2 cm²) per leaflet were sampled at the inoculation points. Representative symptoms are shown for each condition. The amount of fungal genomic DNA (ng) was determined by the standard curve method using *C. cassiicola* Cc-Btub-F1/Cc-Btub-R1 primers (**Annexe 3**). Bars indicate standard errors of the mean between four biological replicates. Letters indicate the significance of between-group differences (Kruskal-Wallis test, $\alpha=0.05$).

3.7. Compared toxicity of CCP and *ccpΔcas1* culture filtrates on eighteen rubber clones

We previously developed an indirect **phenotyping test** to predict the susceptibility of rubber clones to *C. cassiicola* from their sensitivity to fungal exudates (Tran *et al.*, 2016). This test uses **electrolyte leakage measurements** (ELM) to quantify the leaf damages induced by fungal culture filtrates or purified Cas1 toxin applied on detached leaves, after local abrasion of the lower epidermis. In this test, abrasion is required for toxin action; indeed, application of exogenous toxin on intact leaves (without abrasion) induces no significant electrolyte leakage compared to the blank (water) treatment, as shown here on the susceptible clone PB260 (**Figure 45**). We compared the toxicity of culture filtrates from *ccpΔcas1*, CCP and other *C. cassiicola* isolates (**Tableau 9**) on 18 rubber clones from plantations in the Ivory Coast. Purified cassiicolin at three concentrations (Tox1, Tox5 and Tox10) was used as reference. Blank treatments were water (Tox0) and mock-inoculated culture medium (Cz). ANOVA performed on the whole dataset shows significant effects of clones, treatments and clone \times treatment interaction ($p<0.001$,

Annexe 6), explaining 88% of the total variance (R^2), with contributions of 34%, 30% and 24%, respectively. Double hierarchical clustering was used to identify clusters of clones (CL) and treatments (Tr) based on their sensitivity/toxicity profiles (**Figure 47** and **Annexe 7**).

As shown previously on a smaller dataset (Tran *et al.*, 2016), CCP filtrate clusters with the purified cassiicolin at 5 and 10 ng/ μ l (Tox5 and Tox10, respectively), suggesting that *Cas1* is an important factor of CCP filtrate toxicity. It is more distantly associated with two isolates (CNig404 and CCI501, cluster Tr3) of the same type C/*Cas1*, i.e. phylogenetically related to CCP (group C) and carrying the same *Cas1* gene (toxin class *Cas1*). The mutant *ccpΔcas1* filtrate is on average significantly less aggressive than the wild-type CCP filtrate but, interestingly, its toxicity is still strong compared to the blank treatments Tox0 and Cz or to filtrates of low average toxicity clustered in Tr5 and Tr6. The mutant clusters in Tr4 with two A4/*Cas0* isolates of moderate filtrate toxicity, CCI403 and CCI434. Cluster Tr1 contains four filtrates of high mean aggressiveness: three from type A4/*Cas0* isolates and one from a type C/*Cas1* isolate (CCAM3). The A4/*Cas0* type appears to be highly diverse in terms of filtrate toxicity, with representatives in three different clusters.

Deletion of the *Cas1* gene affected the ELM response differentially depending on the clones. The loss of toxicity is globally substantial in CL2 clones and is particularly marked in PB254. It seems that sensitivity to the filtrates in this group of clones is mostly due to sensitivity to *Cas1*. By contrast, CL1 clones are more sensitive on average but they seem to react to factors other than cassiicolin, since all of them remain highly sensitive to the mutant filtrate. On tolerant clones (cluster CL3, including among others GT1, RRIM600 and IRCA41), CCP and *ccpΔcas1* filtrates display comparatively similar low-to-medium toxicity.

These results suggest that (1) sensitivity to cassiicolin is clone-dependent and (2) effectors other than cassiicolin are secreted by CCP in the culture medium, causing toxicity (electrolyte leakage) on specific clones. Some of these factors may be shared with A4/*Cas0* isolates in addition to other C/*Cas1* isolates

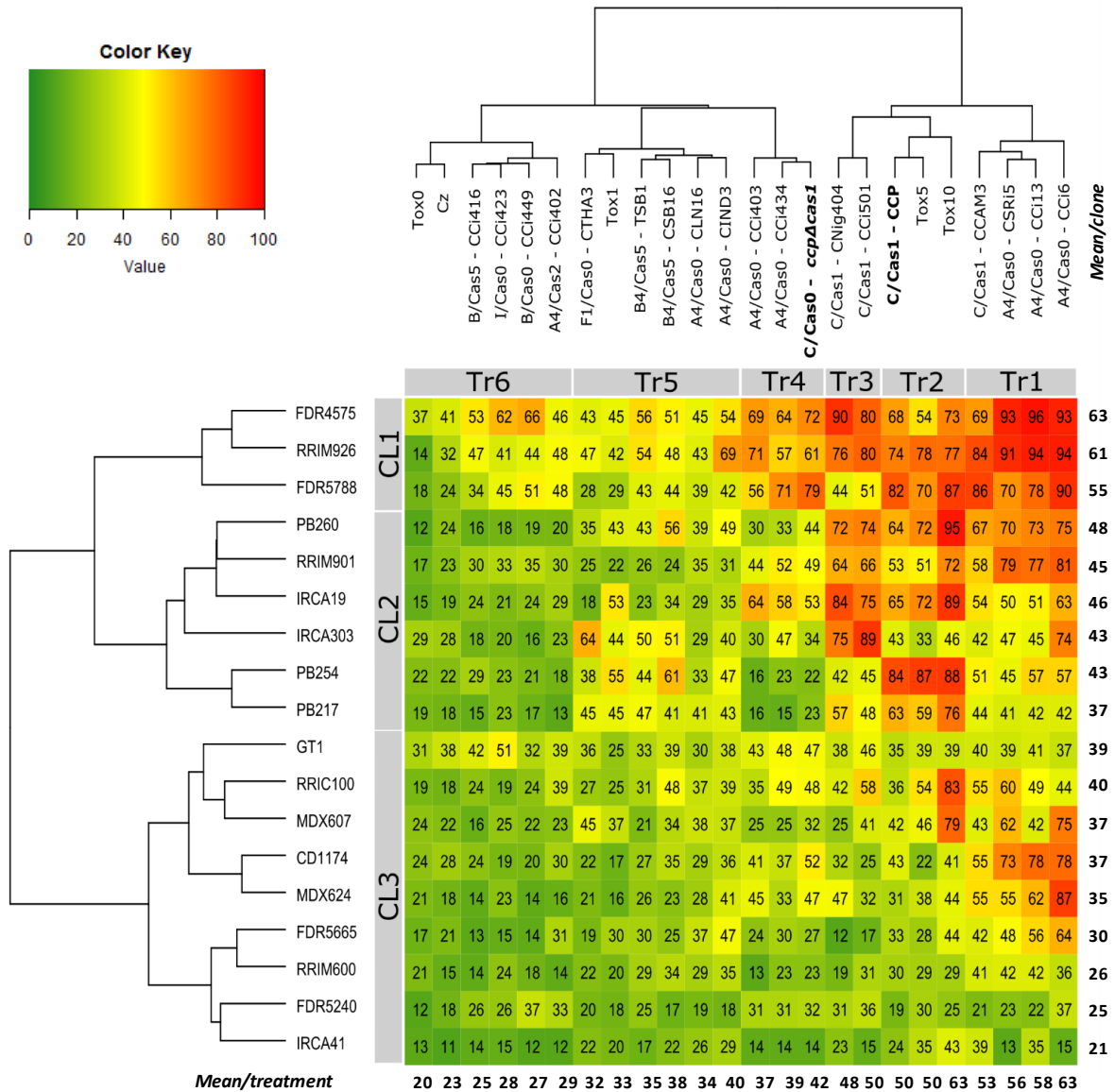


Figure 47 – Toxicity of 24 treatments (Tr) on 18 clones (Cl) expressed as percentage of induced electrolyte leakage

Treatments are culture filtrates from *C. cassiicola* strains of various types (including CCP and *ccpΔcas1*, in bold), purified cassiicolin at different concentrations (1, 5 and 10 ng/μl for Tox1, Tox5 and Tox10, respectively), and blank treatments (water for Tox0 and culture medium for Cz). Colors represent the gradient of the electrolyte leakage (EL%) values, from lowest (green) to highest (red). Means per clone and per treatment are at the edge. Hierarchical classification of clones and treatments was based on Euclidean distances and used Ward’s method of clustering, on R software. Significance of the clone and treatment clusters was estimated using the SNK test (risk $\alpha = 0.05$).

3.8. QTL associated with sensitivity of rubber tree to CCP and *ccpΔcas1* culture filtrates

We previously demonstrated the **polygenic determinism** of rubber tree sensitivity to cassiicolin by phenotyping a population of 191 genotypes (Pop1) from the **PB260 × RRIM600 F1 progeny**, using the ELM-based test (Tran *et al.*, 2016). Two QTL (g2-26 and g4-95) were detected, on the linkage groups 2 and 4. Both were associated with the purified toxin Cas1 as well as the CCP filtrate, demonstrating the importance of Cas1 for the toxicity of CCP. To further confirm this result, we phenotyped another population of 152 genotypes (Pop2) from the same progeny, with filtrate from the deletion mutant *ccpΔcas1*, comparatively to filtrates from CCP and other isolates of various types (**Tableau 11**). The two previously identified QTL were confirmed, with similar percentages of explained phenotypic variance ($12 < R^2 < 17$), stressing out the robustness of this result obtained at one year interval on two different sites. Surprisingly, a third QTL (position g5-73, $R^2=14$) was found associated with the response to CCP filtrate but not with the response to the purified cassiicolin Tox5. However, a LoD score peak under the significance threshold (around 2.5) was detected at the same position with Tox5, on both Pop1 ($R^2=4$) and Pop2 ($R^2=8$), and with CCP filtrate, on Pop2 ($R^2=6$). No peak was detected at that position with *ccpΔcas1* filtrate. This suggested that the QTL at position g5-73 is probably associated with cassiicolin rather than with another effector of CCP filtrate. Whether the discrepancy between the two experiments (on Pop1 and Pop2) was due to environmental differences between the two sites or sampling bias is unclear. With *ccpΔcas1* mutant filtrate, none of the CCP- or Tox5-associated QTL were detected, thus unambiguously confirming the involvement of these loci in rubber tree sensitivity to cassiicolin Cas1. Instead, two new QTL were found (g13-11 and g9-62). Interestingly, these new QTL were also detected with filtrates from isolates CCI403 and CCI434, respectively, both type A4/Cas0. All filtrates of type C/Cas1 revealed the expected significant Cas1-associated QTL (g2-26 and g4-95), except filtrate from CCAM3, isolate in which the *Cas1* gene expression level post-inoculation was lower compared to CCP (Déon *et al.*, 2012a). Filtrates of type A4/Cas0 showed diverse responses, with three filtrates (CCI13, CCI6 and CSR15) revealing one common QTL (g4-32) and the others (CCI434, CCI403 and CIND3) revealing various combinations of two to three QTL.

Tableau 11 – QTL associated with sensitivity to *C. cassiicola* exudates, detected from the PB260 x RRIM600 F1 family

Treatment	Type	Population	QTL													
			g2-26	g3-11	g4-32	g4-95	g5-73	g6-26	g9-62	g9-122	g12-53	g13-102	g14-64	g16-11	g16-77	g18-87
Tox5	C/Cas1	Pop1	17	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	17	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CCP	C/Cas1	Pop1	12	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	12	-	-	13	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>ccpΔCas1</i>	C/Cas0	Pop2	-	16	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	
CCi501	C/Cas1	Pop2	16	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CNig404	C/Cas1	Pop2	20	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CCAM3	C/Cas1	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	13	11	-	-	-	
CCi405	A4/Cas1	Pop2	-	-	-	-	-	20	10	-	-	-	-	-	-	
CCi434	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	13	11	-	-	-	-	-	-	
CCi403	A4/Cas0	Pop2	-	13	-	-	-	10	-	-	-	-	12	-	-	
CIND3	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	11	-	
CCi13	A4/Cas0	Pop1	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CCi6	A4/Cas0	Pop1	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSRi5	A4/Cas0	Pop1	-	-	12	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	
CSB16	B4/Cas5	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	
TSB1	B4/Cas5	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	
CLN16	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CTHA3	F1/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cz		Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tox0		Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Progenies from the PB260 × RRIM600 F1 family were planted in two populations at SOGB (Pop1) and SAPH-Toupah (Pop2). Treatments (column 1) were purified cassiicolin *Cas1* at 5 ng/μL (Tox5), culture filtrates from various isolates types including the wild-type CCP and deletion mutant *ccpΔCas1*, and blanks (water Tox0 and culture medium Cz). Sensitivity to the treatments was estimated as the percentage of induced electrolyte leakage (%EL). QTL were considered significant at the LoD threshold of 4.2 ($\alpha=0.05$). QTL are named by the number of the linkage group (g) on which they are located, and their position (in bold). Numbers are percentage of explained phenotypic variance (R^2).

4. Discussion

4.1. Cassiicolin *Cas1* is a necrotrophic effector required for the successful development of *C. cassiicola* strain CCP in the rubber tree

A number of converging results suggest that *Cas1* cassiicolin plays an important role as an effector of CLF in the rubber tree (Barthe *et al.*, 2007; Breton *et al.*, 2000; de Lamotte *et al.*, 2007; Déon *et al.*, 2012a; Déon *et al.*, 2012b; Lopez *et al.*, 2018). Here, using a *Cas1* deletion mutant, we functionally demonstrated the essential role of this toxin for the virulence of the highly aggressive strain CCP.

We obtained a single conform mutated strain (*ccpΔcas1*) in which the *Cas1* gene was fully removed by homologous recombination (Figure 38 and 39). *In vitro* analysis showed that the deletion of the *Cas1* gene affects neither the mycelium growth speed nor the sporulation or germination capacity of the fungus (Figure 40 and Tableau 10), all of which are parameters that could indirectly impair its virulence.

Cas1 deletion induced a partial decrease or total loss of virulence depending on the test conditions, in all the susceptible rubber clones tested (Figure 41, 42, 43 and 44). The mutant *ccpΔcas1* appears fully avirulent when inoculated on intact (non-detached) leaves of two susceptible clones, even at nine dpi on the highly susceptible IRCA631 (Figure 44). We can thus conclude that no effector beside cassiicolin is required for necrotrophy on these clones. On detached leaves however, we measured low but significant residual symptoms with the deleted strain *ccpΔcas1* at high conidia concentration, especially after longer incubation times (Figure 42). Assuming that no other effector contributes to necrotrophy, at least in the clone IRCA631 common to both experiments, we can raise the hypothesis that leaf excision activated senescence processes in the leaf tissue, thus allowing the saprotrophic development of the deletion mutant. Indeed, excised leaves immediately undergo senescence, characterized by a decrease in chlorophyll, which starts immediately in darkness (Biswal *et al.*, 1983; Kar *et al.*, 1993; Thimann and Satler, 1979). Abscission and wounding involve common signaling pathways in which ethylene and jasmonate play a central role (Bari and Jones, 2009), leading to local cell death as a defense mechanism. These signals are thought to trigger a shift toward saprotrophy in the endophytic fungi inhabiting the leaf tissues (Promputtha *et al.*, 2007; U'Ren and Arnold, 2016). Our results suggest that the CCP isolate is equipped both for necrotrophy, thanks to cassiicolin, and for saprotrophy, thanks to other factors potentially activated during leaf senescence, including in the cassiicolin-deleted strain.

To test the wounding effect and its possible interaction with cassiicolin further, we locally abraded the epidermis of detached leaves prior to inoculation with conidia (**Figure 43**), in the same way as we tested filtrates toxicity with the ELM-based method (). Abrasion alone followed by a blank treatment with water induces no visible symptom in the inoculation experiment (**Figure 47**), and the lowest average electrolyte leakages in the ELM-based test (**Figure 47**). Abrasion is expected to generate DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) that trigger basal plant defenses known as DAMP-Triggered Immunity or DTI (Heil and Land, 2014; Zipfel, 2014; Pandey *et al.*, 2016; Mengiste, 2012). However, DTI was clearly not able to prevent invasion by the fungus in our study. To the contrary, abrasion increases CCP-induced symptoms, markedly in the susceptible clones but also, moderately, in the tolerant clone GT1. It also favors the development of the deletion mutant, although the symptoms remain moderate, with no strong difference between susceptible and tolerant clones, compared to CCP (**Figure 43**). Here again, the clone-independent wound effect observed with the deletion mutant could be accounted for saprotrophy. By contrast, the marked clone-dependent wound effect observed with CCP suggests a synergy between cassiicolin and wounding.

Application of purified toxin on abraded leaves induced significant electrolyte leakages, proportional to the toxin concentration (**Figure 47**). This effect was clone-dependent, which implies that clone-specific sensitivity factors are required for the action of the toxin. Cassiicolin without abrasion fails to induce symptoms (**Figure 47**). This suggests that the toxin alone cannot pass the physical barriers of the leaf without active fungal intervention, unless these barriers are wound-disrupted. Cassiicolin *per se* is thus unlikely to play a direct role in the penetration of the cells. Other fungal molecules may be required, such as hydrolytic enzymes. We previously showed that a number of fungal genes are up-regulated during early infestation (24 and 48 h post-inoculation) of the susceptible clone PB260 by the isolate CCP. Among those, ninety-two encode putative effectors, such as carbohydrate-active enzymes (CAZymes) supposed to participate in cell wall hydrolysis and (Lopez *et al.*, 2018) thus fungal penetration.

The synergy between cassiicolin and wounding raises also the hypothesis that cassiicolin may boost the plant defense pathways leading to programmed cell death, and thus favor fungal development of *C. cassiicola* isolate CCP, owing to its necrotrophic life style. Under this theory, prior activation of the plant defenses through wounding may logically amplify the toxin effect. In the inoculation experiment on intact (non-detached) leaves, it can be assumed that the fungal mechanisms required for penetration are functional in both the wild type and mutated strains, and that immunity is triggered by MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) rather than DAMPs. Unlike the wild-type strain, the mutated strain is unable to overcome this immunity, thus

further supporting the idea that cassiicolin may manipulate the DAMP- or MAMP-induced plant defenses towards increased cell death. Indeed, *in vivo* biochemical complementation showed that *ccpΔcas1* could only colonize the plant in presence of exogenous purified cassiicolin (**Figure 46**). Otherwise, it is stopped at the inoculation point.

The clone-dependent response observed with CCP and the purified toxin but not with the *Cas1*-deleted strain implies that clone-specific susceptibility factors are required for the action of the toxin. Our results confirmed that cassiicolin is a necrotrophic effector required for the virulence of CCP in susceptible rubber clones carrying appropriate susceptibility factor(s), in agreement with the NETS (necrotrophic effector-triggered susceptibility) model (Liu *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2010).

4.2. Effectors other than cassiicolin

The objective of this study was not only to confirm the role of cassiicolin in virulence on the rubber tree but also to evaluate the potential contribution of other effectors in this virulence. A previous *in silico* analysis has demonstrated the presence of 2,870 putative effectors in the CCP genome, of which 92 were differentially expressed (mostly over-expressed) during the compatible interaction with the susceptible clone PB260 (Lopez *et al.*, 2018). Here we demonstrated that deletion of the *Cas1* gene suppressed all virulence when inoculation was performed on non-detached leaves, suggesting that in this context, there was no other effector able to significantly drive virulence in the absence of cassiicolin. However, as discussed above, some other effectors may be involved more in saprotrophy, allowing colonization of the decaying tissues in senescing or wounded leaves.

We also demonstrated, in two independent ELM-based experiments, that *Cas1* deletion significantly modified CCP filtrate toxicity profile over a range of clones. In the first experiment on 18 selected clones (**Figure 47**), some are sensitive to the CCP filtrate but weakly or not sensitive to the *ccpΔcas1* filtrate; other display similar responses to both filtrates, suggesting that their sensitivity in the conditions of the ELM-based test was *Cas1*-independent. In the second experiment, on 343 progenies from the PB260 × RRIM600 family (**Tableau 11**), *ccpΔcas1* filtrate no longer reveals the two *Cas1*-associated QTL, detected with either the purified cassiicolin, CCP filtrate, or other *Cas1*-producing filtrates. However, the mutant filtrate retains enough toxicity to reveal two new QTL. In both experiments (**Figure 47** and **Tableau 11**), *ccpΔcas1* is closely associated with two A4/*Cas0* isolates (CCi403 and CCi434) based on filtrate toxicity profiles, suggesting that they may share common effectors. In CCP filtrate, cassiicolin may mask or suppress the effect of other common effectors. Other A4/*Cas0* isolates display different toxicity

profiles (**Figure 47** and **Tableau 11**), suggesting a different composition in effectors able to confer strong filtrate toxicity on specific clones, independently of *Cas1*.

Gene manipulation is a powerful method that helped characterizing several fungal effectors. In *Stagonospora nodurum* for example, multiple necrotrophic effectors (NEs) interact with dominant susceptibility genes of wheat to trigger susceptibility (Shi *et al.*, 2015). Disruption of the genes encoding the SnTox1 or SnTox3 effectors in virulent isolates resulted in the suppression of the disease on wheat lines carrying the cognate Snn1 and Snn3 susceptibility loci (Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009). In *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*), another necrotrophic fungus of wheat, isolates are classified into 8 races, determined by their composition in the host selective toxins ToxA, ToxB and ToxC (Ciuffetti *et al.*, 2014). Deletion of the ToxA encoding-gene in a race 1 isolate (carrying both ToxA and ToxC) showed that ToxA can obscure the expression of symptoms caused by other toxins (including ToxC) in some cultivars (Manning *et al.*, 2015). They hypothesized that *ToxA* gene expression may cause a repression of other toxin-encoding genes. To test this hypothesis in our pathosystem, it would be interesting to (i) analyze the virulence of *ccpΔcas1* by spore inoculation on the clones FDR4575 or FRD5788 that appeared highly sensitive to *ccpΔcas1* filtrate (**Figure 47**), and (ii) compare CCP and *ccpΔcas1* transcriptomes in order to identify genes differentially expressed as a result of *cas1* deletion.

In *C. cassicola*, homologous recombination was recently used for the functional characterization of the CCK1 MAP kinase (Liu *et al.*, 2017). This study demonstrated that CCK1 is a versatile regulator of many physiological aspects such as mycelial growth and differentiation, pigmentation, conidiation or production of secreted hydrolytic enzymes, thus indirectly influencing pathogenicity on the rubber tree.

In our analysis, QTL analysis with CCP and *ccpΔcas1* filtrates, together with the purified cassicolin *Cas1*, unambiguously confirmed that at least two loci (and potentially three) are associated with the sensitivity to *Cas1* in the PB260 x RRIM600 family, in the conditions of the ELM-based test. It is noteworthy that, in many pathosystems involving necrotrophic pathogens, NEs usually interact with single cognate plant receptors to mediate NETS (de Wit *et al.*, 2016). However, intermediate interactors may sometime be involved to modulate the intensity of the response (Lu *et al.*, 2014). Further investigation of *Cas1* molecular targets may help understanding the polygenic determinism of rubber tree sensitivity to *Cas1*.

5. Conclusions

Our results confirmed that cassiicolin is a necrotrophic effector required for the virulence of CCP in susceptible rubber clones carrying specific susceptibility factors, in agreement with the NETS (necrotrophic effector-triggered susceptibility) model. Other effectors secreted by CCP may be involved either in saprotrophy in senescing tissue or, putatively, in necrotrophy in other clones carrying appropriate susceptibility factors. Demonstrating the role of cassiicolin *Cas1* in the virulence of CCP was essential for the purpose of developing effector-based selection on rubber tree, a promising approach for creating new clones with improved tolerance to CLF.

Abbreviations

CLF, Corynespora Leaf Fall; QTL, Quantitative Trait Locus; SOGB, Société des caoutchoucs de Grand Béréby; SAPH, Société Africaine de Plantation d'Hévéa; ELM, Electrolyte leakage measurements; PDA potato dextrose agar; Cz, Czapeck medium; PCR, polymerase chain reaction; CAZymes, carbohydrate-active enzymes; DAMPs, damages-associated patterns; MAMPs, Microbe-associated patterns.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent to publish

All the authors read and approved the manuscript. All funders have read the manuscript and agreed to its publication.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

Competing interest

We have received funding from a commercial source (Michelin, SIPH and SOCFIN). However, this does not alter our adherence to BMC policies on sharing data and materials. None of the authors have competing interests.

Funding

Researches were supported by IFC (“Institut Français du Caoutchouc”, Paris, France), the companies Michelin (<http://www.michelin.com/>), SIPH (“Société Internationale de Plantations

d'Hévéa”), and Socfin (<http://www.socfin.com/>). This support includes salary for SR, DMT and MD. The plantations SOGB (“Société des Caoutchoucs de Grand-Béréby”, belonging to the SOCFIN group) and SAPH-Toupah (“Société Africaine de Plantation d'Hévéa”, belonging to the SIPH group), provided access and logistic assistance for field and lab experiments in Côte d'Ivoire.

Authors' contributions

SR carried out the molecular characterization of the mutant strains, designed and performed the inoculation experiments, and drafted the manuscript. MD performed the homologous recombination experiments. DMT performed the toxicity tests and QTL analyses. ACD supervised the QTL analyses. DG participated in the design of the inoculation experiments. MS and AM oversaw the research in Ivory Coast. VPR participated in the design of the study, coordinated the study and helped draft the manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank Thomas Guillemette and Benoit Calmes, from Angers University (France), for providing plasmid pCB1636 and procedures for targeted gene deletion in fungi. They also thank Christelle Boisselet and Clémence Morand for assistance in plant maintenance in the green house at Université Clermond Auvergne. Finally, the authors acknowledge the technical teams at SOGB and SAPH plantations for assistance in field and laboratory experiments in Côte d'Ivoire.

CHAPITRE 3

Identification chez l'hévéa de facteurs de sensibilité à Cas1

1. Contexte d'étude et objectifs

Nous venons de voir dans les deux chapitres précédents que les souches porteuses du gène *Cas1* représentent environ un quart de l'inoculum naturel de *C. cassiicola* en Afrique de l'Ouest, et que la cassiicoline **Cas1** est un effecteur de nécrotrophie nécessaire à la virulence de la souche CCP sur les clones d'hévéa testés. C'est donc un **candidat pertinent** pour développer une stratégie de "sélection assistée par effecteur" : en éliminant les clones les plus sensibles à la cassiicoline Cas1 des recommandations de planting et des schémas de sélection, on peut espérer réduire la pression de l'inoculum le plus virulent, du moins pour une part conséquente de l'inoculum présent en Afrique de l'Ouest, et ainsi limiter la maladie CLF. Le test toxine consistant à phénotyper les clones (en laboratoire, sur feuilles détachées) pour évaluer leur sensibilité à la cassiicoline purifiée est une méthode efficace mais encore assez lourde à mettre en œuvre. L'identification de facteurs de sensibilité à la cassiicoline chez l'hévéa pourrait permettre de développer des stratégies de sélection par génotypage, plus simples et plus rapides.

L'**objectif** de ce troisième chapitre de thèse est d'identifier chez l'hévéa les acteurs moléculaires interagissant directement avec la cassiicoline Cas1 et/ou permettant d'expliquer les différences observées entre un clone sensible et un clone tolérant pour la réponse à la cassiicoline.

Pour cette étude, les clones **PB260** et **RRIM600** ont été choisis, puisque de nombreuses études ont mis en évidence leur sensibilité contrastée à la cassiicoline purifiée, aux spores et au filtrat de culture de la souche CCP (thèses Marine Déon, 2012 ; Tran Dinh Minh, 2016 ; chapitre 2 de ce manuscrit). Comme résumé sur la **Figure 48**, le clone PB260 apparaît sensible aux différents traitements, même lorsque les concentrations en spores ou en toxine purifiée sont faibles (5 spores/ μ l et 1 ng/ μ l, respectivement). Au contraire, seule une forte concentration en spores (50 spores/ μ l) génère des symptômes sur les feuilles détachées du clone RRIM600. Les autres traitements n'ayant aucun effet. On ne parlera alors pas de résistance pour décrire ce clone mais bien de tolérance. A noter cependant que l'inoculation de CCP à 10 spores/ μ l sur feuilles non détachées n'induit aucun symptôme sur RRIM600.

Le mode de vie nécrotrophe de *C. cassiicola* implique probablement que les molécules ciblées par la cassiicoline confèreraient une sensibilité plutôt qu'une résistance, conduisant au phénomène de compatibilité et donc à la maladie. On parle alors de **facteurs de sensibilité**. Ainsi, pour expliquer les différences de sensibilité observées entre les clones PB260 et RRIM600 nous avons émis les hypothèses que soit ces facteurs de sensibilité sont présents uniquement chez le clone sensible, soit qu'ils sont présents chez les deux clones mais s'exprimeraient différemment.

Deux approches complémentaires ont été suivies :

- Une **approche** d'interaction protéine-protéine par la technique de **double hybride en levure**, afin d'identifier les interacteurs protéiques putatifs de la cassiicoline Cas1 parmi l'ensemble des protéines exprimées en système hétérologues à partir d'une banque d'ADNc de feuilles d'hévéa (clone PB260) inoculées par la souche CCP.
- Une **approche transcriptomique**, afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés suite à l'application de cassiicoline purifiée, en comparant le clone sensible PB260 et le clone tolérant RRIM600.

Dans ce chapitre, nous allons décrire les méthodes et les résultats de chaque approche séparément avant de discuter du rôle de la cassiicoline Cas1 dans l'interaction avec l'hévéa.

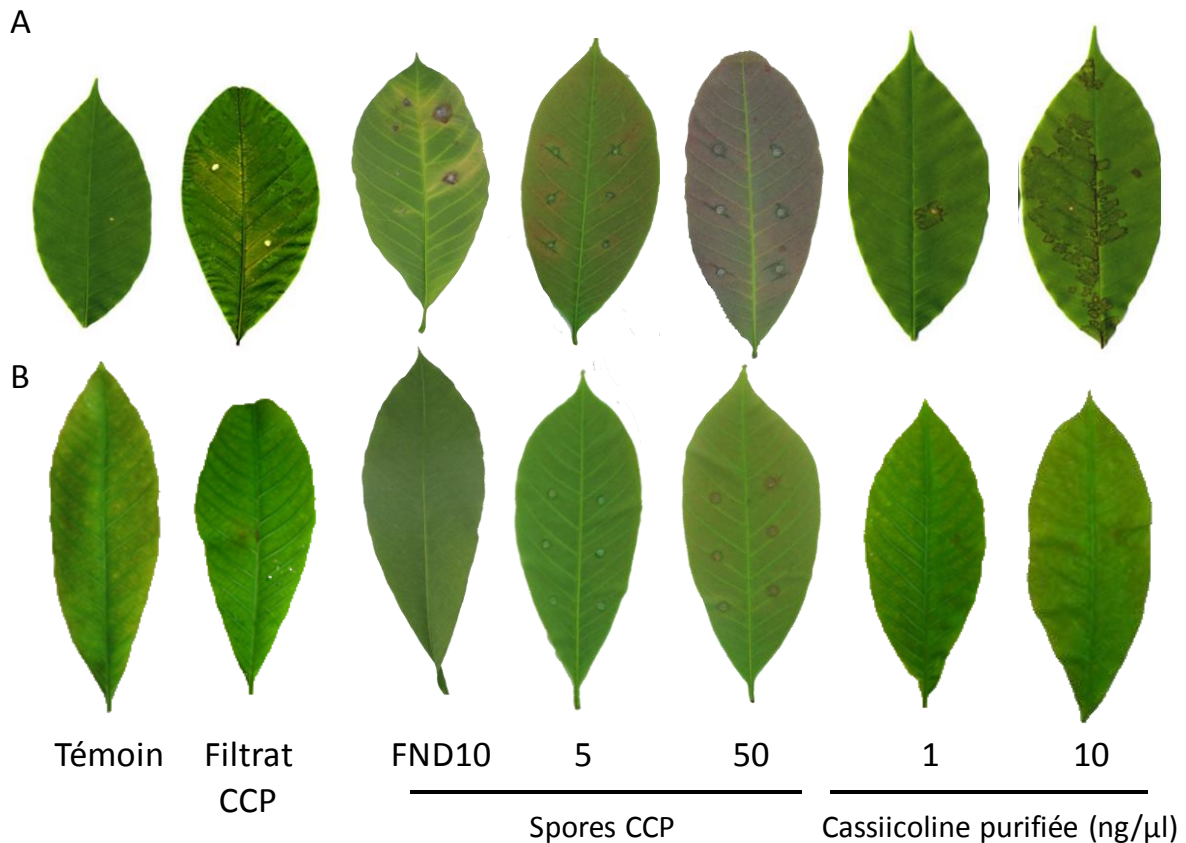


Figure 48 – Sensibilité contrastées des clones PB260 et RRIM600 à différents traitements impliquant la cassiicoline Cas1 (souche CCP ou cassiicoline purifiée)

Des feuilles des clones PB260 (A) et RRIM600 (B) ont été testées pour leur sensibilité à différents traitements : Témoin (Tris-HCL 10 mM), filtrat de culture de la souche CCP, spores de la souche CCP (5, 10 et 50 spores/ μ l) et cassiicoline Cas1 purifiée (1 et 10 ng/ μ l). Tous les traitements ont été appliqués sur feuilles détachées, sauf pour les échantillons FND10 (feuilles non détachées inoculées à 10 spores/ μ l, voir Chapitre 2). Les symptômes ont été observés entre trois et quatre jours après traitements.

Adapté de Déon *et al.* (2012a).

2. Approche double hybride : identification des interacteurs potentiels de la cassiicoline Cas1 chez le clone d'hévéa sensible PB260

2.1. Principe général de la technique

Le double hybride en levure est une technique de **clonage *in vivo*** permettant de détecter une interaction physique entre deux partenaires protéiques (**Figure 49**). La totalité du protocole a été réalisée à l'aide du système Matchmaker™ de Clontech (Mountain View, CA, USA). Dans ce système, chacun des partenaires protéiques va être fusionnée à une partie du **facteur de transcription GAL4** (Chien *et al.*, 1991; Fields and Song, 1989). La **protéine appât** dont on veut identifier l'interacteur (la cassiicoline dans notre cas), est fusionnée au domaine DBD (DNA-Binding Domain) de GAL4. L'interacteur potentiel, appelé **protéine proie**, est fusionné au domaine AD (Activation Domain) de GAL4. Les deux protéines sont co-exprimées dans une cellule de levure où, si elles sont capables d'interagir, reconstituent un facteur de transcription actif. Il y aura alors transcription de quatre gènes rapporteurs (*HIS3*, *ADE2*, *AUR1-C* et *MEL1*) et apparition d'un phénotype simple à analyser. Seuls les points importants et les différences avec le protocole d'origine seront détaillés.

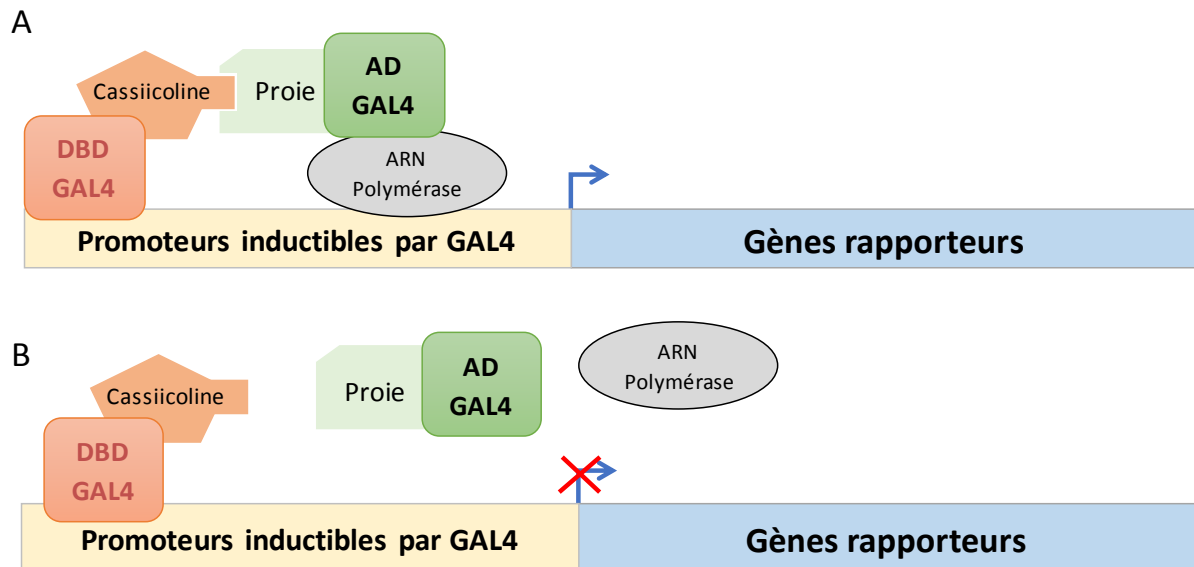


Figure 49 – Principe du double hybride en levure

A, L'interaction physique entre la cassiicoline et une protéine cible (ou proie) présente chez l'hévéa permet aux domaines DBD (DNA-Binding Domain) et AD (Activation Domain) de GAL4 de se rapprocher et de reconstituer un facteur de transcription actif. Ce qui aura pour conséquence d'activer les gènes rapporteurs (*HIS3*, *ADE2*, *AUR1-C* et *MEL1*).

B, L'absence d'interaction entre les deux protéines n'entraîne pas l'activation des gènes rapporteurs.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Préparation des échantillons foliaires inoculés

Les hévéas (clone **PB260**) ont été cultivés en serre à Clermont-Ferrand (Université Clermont Auvergne, France), à la température de 28/26°C jour/nuit et avec un taux d'humidité compris entre 60 et 80%. Des feuilles au stade de développement C (Hallé and Martin, 1968) ont été prélevées et chaque foliole déposée face inférieure vers le haut dans une grande boîte en plastique transparente Nunc™ 245 x 245 mm (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA), sur une feuille de papier humide. Puis, elles ont été inoculées avec une suspension sporale de la souche de référence CCP de *C. cassiicola*. Cette dernière a été préparée à partir d'une culture mycélienne maintenue sur milieu de PDA (DIFCO, Detroit, MI, USA) additionnée d'acide lactique 0,02% pendant sept jours à l'obscurité puis deux jours en alternance jour/nuit (photopériode 12h) à 26°C. Les spores ont été récoltées dans de l'eau ultrapure, filtrées à travers un tamis cellulaire de 100 µm (Biologix Group Ltd, Jinan, China) puis diluées afin d'atteindre une concentration de 5 spores/µl. Enfin, quatre folioles du clone PB260 ont été inoculées avec la suspension sporale de CCP à raison de 6 gouttes par foliole (20 µl par goutte) comme décrit précédemment (Déon *et al.*, 2012a et 2014; Tran *et al.*, 2016). Les folioles inoculées ont été maintenues à 25°C dans le noir pendant 12, 24, 48 et 72h. Des disques foliaires de 2,2 cm² ont été prélevés pour chaque goutte à l'aide d'un emporte-pièce, aux différents temps d'incubation. Pour chaque feuille, les disques ont été rassemblés par trois dans un même tube (deux tubes par feuille), congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'au broyage.

2.2.2. Souches de levures et de bactéries

Les souches de **levure haploïdes** Y2HGold et Y187 de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Clontech, Mountain View, CA, USA) utilisées dans cette étude sont toutes deux auxotrophes pour l'adénine, l'histidine, la leucine et le tryptophane et sont délétées pour les gènes *GAL4* et *GAL80* (génotype détaillé dans le **Tableau 12**).

La souche **Y2HGold**, de type sexuel MATa, a été transformée par le plasmide pGBKT7 contenant la protéine appât. Elle possède quatre gènes rapporteurs, possédant chacun son propre promoteur inductible par le facteur de transcription GAL4 :

- *AURI-C*, version mutée du gène *AURI* codant pour l'enzyme inositol phosphoryl ceramide synthase. Son expression confère une forte résistance à l'antibiotique Auréobasidine A (Aba), inhibitrice de la synthèse des céramides.
- *HIS3*, nécessaire à la synthèse d'histidine, permet à la levure de se développer sur un milieu dépourvu d'histidine.
- *ADE2*, nécessaire à la synthèse d'adénine, permet alors à la levure de se développer sur un milieu dépourvu d'adénine.

- *MEL1*, code pour l' α -galactosidase, enzyme capable de cliver le substrat chromogénique X- α -Gal lorsqu'il est ajouté au milieu nutritif. Les levures prennent alors une teinte bleutée.

La souche de levure **Y187**, de type sexuel MAT α , a été transformée par le plasmide pGADT7-Rec contenant la séquence ADNc d'une protéine proie.

Etant de type sexuel différent et compatible, les souches YH2Gold et Y187 peuvent fusionner et générer une souche de levure diploïde possédant les caractéristiques génétiques de ces deux souches. Elles ont été maintenues sur du milieu nutritif YPDA (**Annexe 8**) et cultivées à 30°C dans le noir pendant 3 jours.

Des souches d'*Escherichia coli* **JM109** compétentes (génotype détaillé dans le **Tableau 12**), commercialisées par Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), ont servi à multiplier le plasmide pGBKT7 contenant l'appât. Elles ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Tableau 12 – Génotypes des souches Y2HGold, Y187 et JM109

Souches de levures	Génotype
Y2HGold	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3, GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2, URA3 : : MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA}, AUR1-C MEL1</i>
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met⁻, URA3 : : GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-LacZ, MEL1</i>
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), relA1, supE44, λ⁻, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15], lde3</i>

2.2.3. Vecteurs plasmidiques

Les plasmides pGADT7-Rec et pGBKT7 utilisés dans cette étude sont commercialisés par Clontech (Mountain View, CA, USA).

Le vecteur d'expression **pGADT7-Rec** (8 059 pb) a été utilisé pour la construction d'une banque ADNc par recombinaison homologue entre les sites SMART III et CDS III (**Annexe 9**). Il permet d'exprimer une protéine d'intérêt, fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4. Il possède un gène conférant la résistance à l'ampicilline (Amp^r) permettant la sélection chez *E. coli* et un marqueur nutritionnel de la synthèse de leucine (*LEU2*) permettant la sélection chez *S. cerevisiae*. Le plasmide **pGBKT7** (7 300 pb) permet d'exprimer une protéine d'intérêt appât, fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (**Annexe 10**). Il possède un gène conférant la résistance à la kanamycine (Kan^r) permettant la sélection chez *E. coli* et un marqueur nutritionnel de la synthèse du tryptophane (*TRP1*) permettant la sélection chez *S. cerevisiae*.

2.2.4. Préparation des acides nucléiques

Les échantillons de feuilles inoculées et le mycélium de la souche CCP âgée de sept jours ont été broyés à l'azote liquide. Les ARNs totaux ont été extraits dans du tampon d'extraction CTAB selon le protocole décrit par Chang *et al.* (1993). Afin de s'assurer de la réussite de l'extraction et de la pureté des échantillons ARNs, une mesure au Nanodrop et une analyse sur un gel agarose 2% dans un tampon TAE 0,5X additionné de Sybr Safe (0,1 µg/ml) ont été évalués. Une transcription inverse a été effectuée sur l'échantillon CCP à partir de 1 µg d'ARN totaux à l'aide du kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), selon les recommandations des fournisseurs.

2.2.5. Construction de la banque d'ADNc hébergée dans la souche Y187

Une **banque d'ADNc** a été créée à partir des **ARNs totaux** de feuilles d'hévéa (clone sensible **PB260**) **inoculées par la souche CCP** et extraits 12, 24, 48 et 72h après inoculation, en utilisant la technologie SMARTTM du kit « Make your own Mate & Plate Library System » (Clontech Cat. No. 630490). La **Figure 50** reprend les principales étapes de la construction de la banque.

Synthèse d'ADNc

Le premier brin d'ADNc a été synthétisé à partir de 1,5 µg d'ARNs totaux, comprenant 375 ng d'ARNs de chaque condition (12, 24, 48 et 72h), 10 µM d'oligonucléotides SMART III (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG-3'), 10 µM d'amorces CDS III (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCCGACATG-d(T)₃₀VN-3) et 200 U de la reverse transcriptase MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), selon les recommandations des fournisseurs. Le deuxième brin d'ADNc a été amplifié par PCR longue distance sur 20 cycles à partir de 2 µl de produit PCR d'ADNc simple brin et à l'aide du kit Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech Cat. No. 639201). Pour se débarrasser des fragments d'ADNc de faible poids moléculaire, des petits fragments d'ADNc contaminants et des nucléotides non incorporés, 3 µg d'ADNc double brin ont été purifiés sur une colonne CHROMA SPINTM TE-400 (Clontech Cat. No. 630490) sélectionnant les molécules dont la taille est supérieure à 200 pb. La qualité des ADNc double brin purifiés a été analysée par électrophorèse sur un gel agarose 2% dans un tampon TAE 0,5X additionné de Sybr Safe (0,1 µg/ml).

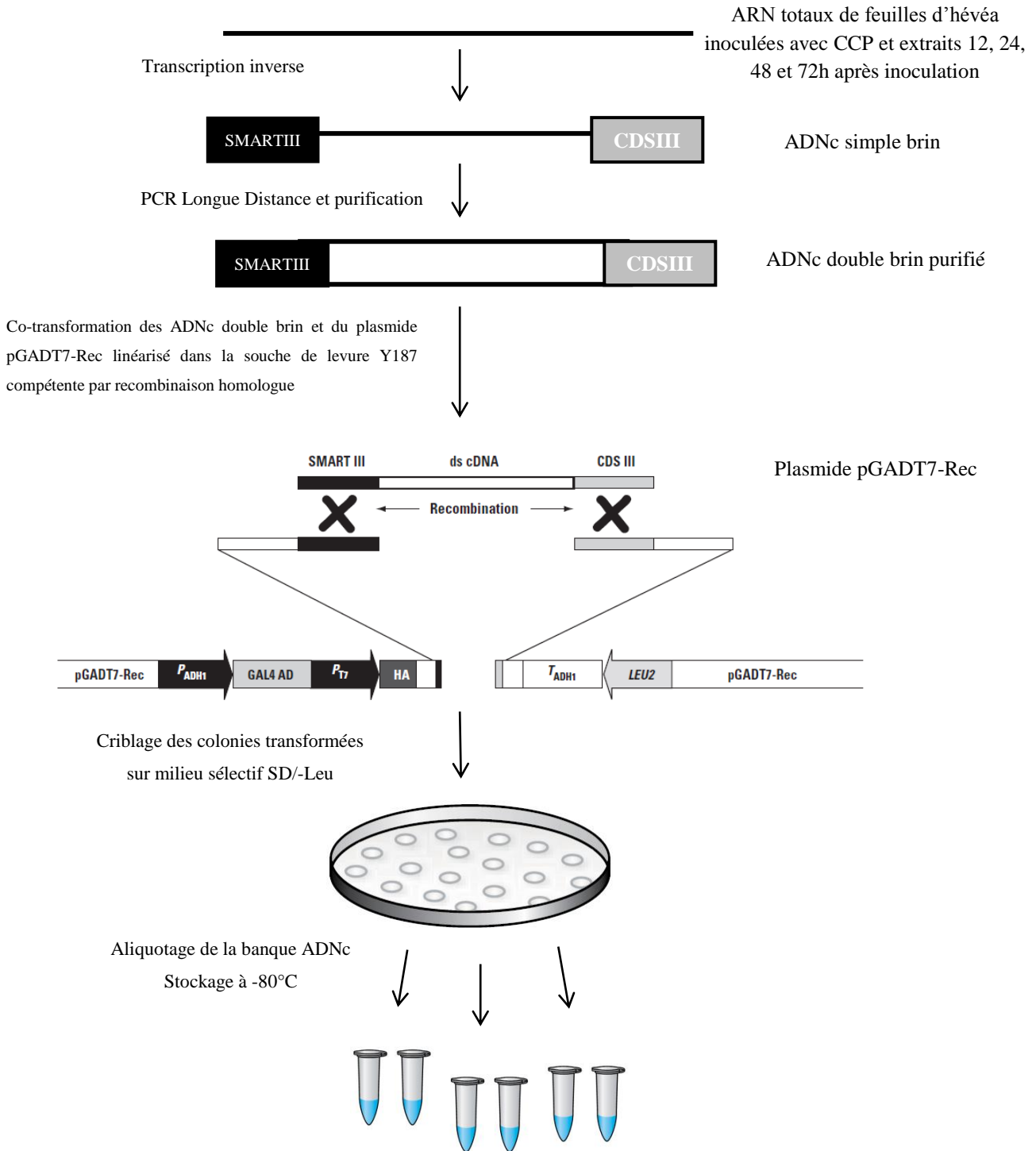


Figure 50 – Schéma simplifié de la construction de la banque ADNc dans la souche de levure Y187 selon le protocole Make Your Own "Mate and Plate" Library System (Clontech)

La construction de banque ADNc dans les cellules de levures Y187 repose sur un clonage par recombinaison homologue *in vivo* directement dans la levure entre les séquences adaptatrices flanquant les ADNc double brin (SMART III et CDS III) et des séquences homologues dans le plasmide pGADT7-Rec (Clontech). Le vecteur pGADT7-Rec contenant le gène codant une enzyme de la biosynthèse de la leucine (*LEU2*) permettant le criblage des levures transformées sur du milieu sélectif SD/-Leu.

Construction et évaluation de la banque ADNc

La banque d'ADNc a été réalisée dans les souches de levures Y187. Ces dernières ont été rendues compétentes, puis co-transformées à grande échelle (library-scale) par choc thermique avec 4 µg d'ADNc double brin purifiés et 3 µg de vecteur plasmidique pGADT7-Rec linéarisé (**Annexe 9**) à l'aide du kit Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech, Cat. No. 630439). Cette étape permet le clonage par recombinaison homologue *in vivo* des ADNc dans le vecteur pGADT7-Rec, entre les séquences SMART III et CDS III situées en aval du domaine AD du facteur de transcription GAL4. Les levures transformées ont ensuite été réparties sur 100 boîtes de Pétri (150 mm de diamètre) contenant du milieu de culture sélectif SD/-Leu (**Annexe 8**) et incubées à 30°C dans le noir jusqu'à apparition des colonies (quatre jours). En parallèle, 100 µl de ces cellules de levures transformées ont été diluées au 1/10 et au 1/100, puis étalées sur du milieu SD/-Leu et incubées dans les mêmes conditions. Le but étant de calculer le nombre de clones indépendants (CI), à l'aide de la formule suivante, prenant en compte le nombre de clones de levures formées ou cfu (colony formed units) :

$$CI = \frac{cfu \text{ sur } SD/-Leu \times \text{volume de resuspension (ml)}}{\text{Volume déposé sur la boîte (ml)}} \times \text{facteur de dilution}$$

La banque doit contenir au minimum 1 million de clones indépendants.

Après 4h à 4°C, toutes les levures ont été collectées, rassemblées dans 1 X de milieu de culture YPDA (**Annexe 8**) contenant 25% de glycérol et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2.6. Clonage de l'appât et tests d'auto-activation et de toxicité

L'**appât** correspond à l'ADNc codant la **cassiicoline mature** (27 acides aminés), cloné dans le plasmide **pGBKT7** en aval du domaine DBD du facteur de transcription GAL4 (**Annexe 10**), puis introduit dans la souche de levure **Y2HGold**.

Obtention de la construction pGBKT7-cassiicoline

Dans un premier temps, 1 µg du vecteur pGBKT7 a été linéarisé par double digestion enzymatique de 3h à 37°C, avec 10 U de BamH1 (BioLabs, Ipswich, MA, USA) et 10 U d'EcoR1 (BioLabs, Ipswich, MA, USA), selon les recommandations des fournisseurs. Puis, l'ADN plasmidique linéarisé a été purifié grâce au kit Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) et déposé sur gel agarose 1,2% (TAE 0,5X) additionné de Sybr Safe (0,1 µg/ml). L'ADNc d'intérêt de la souche CCP a été amplifié par PCR à l'aide du kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) et 200 nM des amorces suivantes Y2H-Cas1-F1 : 5' **C ATG GAG GCC GAA TTC CAG ACT TGC GTA AGC TGT GTC AAT** 3' et Y2H-Cas1-R1 : 5' **G CAG GTC GAC GGA TCC ACA TCC CGA ACA AGC CCA AGA ATT** 3'. Ces amorces contiennent 24 pb homologues avec la séquence de la

cassiicoline mature (en vert) et 15 pb homologues avec le plasmide pGBKT7 (en bleu). Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

Pour cloner la séquence de la cassiicoline mature dans le vecteur pGBKT7, une réaction de ligation a été réalisée à l'aide du kit In-Fusion® Ready Vector Cloning (Clontech Cat. No. 639619) en mélangeant 100 ng du vecteur pGBKT7 linéarisé et purifié, 50 ng de produits PCR purifié et 5 X de tampon contenant l'enzyme In-fusion. Le mélange a ensuite été incubé 15 min à 37°C, suivie de 15 min à 50°C et 2 min dans la glace. Puis, le produit de ligation a été dilué dans 20 µl de tampon TE (100 mM Tris pH8, 1 mM EDTA). Enfin, 200 µl de bactéries compétentes JM109 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ont été transformées par choc thermique avec 2,5 µl du plasmide contenant l'insert d'intérêt, selon le protocole pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA). Le plasmide recombinant a ensuite été extrait des bactéries à l'aide du kit Plasmid Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les recommandations des fournisseurs. La construction pGBKT7/cassiicoline a été vérifiée par séquençage du plasmide contenant l'insert à l'aide des amorces Y2H-Cas1-F1 et Y2H-Cas1-R1 ([Annexe 3](#)).

Transformation de la construction pGBKT7/cassiicoline dans la souche Y2HGold

La souche de levure Y2HGold a été rendue compétente puis transformée à petite échelle (small-scale) par choc thermique à partir de 100 ng de la construction pGBKT7-cassiicoline à l'aide du kit Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech Cat. No. 630439) selon les recommandations des fournisseurs. Les levures transformées ont été sélectionnées sur du milieu sélectif SD/-Trp ([Annexe 8](#)) et incubées 3 jours à 30°C.

Tests d'auto-activation et de toxicité

Pour vérifier si la protéine appât n'active pas de manière autonome les gènes rapporteurs en l'absence de protéine proie, des levures Y2HGold ont été transformées avec 100 ng du plasmide recombinant pGBKT7/cassiicoline (Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2, Clontech Cat. No. 630439), et étalées sur du milieu SD/-Trp additionné de X- α -Gal avec ou sans Auréobasidine (Aba) ([Annexe 8](#)). Dans le cas d'une auto-activation de la protéine appât, des levures peuvent se développer sur du milieu avec Aba et apparaissent bleues en présence de X- α -Gal.

Pour tester si la protéine appât n'est pas toxique pour la levure, des levures Y2HGold ont été transformées avec soit 100 ng du plasmide recombinant pGBKT7/cassiicoline, soit avec 100 ng du plasmide pGBKT7 vide (Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2, Clontech Cat. No. 630439), et étalées sur du milieu SD/-Trp ([Annexe 8](#)). Dans le cas d'une toxicité de la protéine appât, les levures transformées avec la construction pGBKT7/cassiicoline seront significativement plus petites que celles transformées avec le vecteur vide.

2.2.7. Fusion des souches Y187 et Y2HGold ou ‘mating’

Etant de type sexuel différent, les souches de levures haploïdes Y187 et Y2HGold peuvent fusionner pour former une cellule de **levure diploïde** très caractéristique (**Figure 51**), et ainsi permettre l'interaction entre les protéines recombinantes. Pour réaliser cette fusion, 50 ml d'une culture liquide ($DO_{600nm} = 0.8$) de la souche Y2HGold contenant la protéine appât a été mis au contact d'un millilitre de la banque d'ADNc puis placé dans un incubateur de manière à atteindre trois quarts de cellules de levures diploïdes (20 à 24h). Une partie de cette culture de levures diploïdes a ensuite été diluée à 1/10, 1/100 et 1/1000, étalée sur les milieux sélectifs SD/-Leu, SD/-Trp et SD/-Trp/-Leu (**Annexe 8**) et incubée pendant 3 jours à 30°C. Les colonies poussant sur les différents milieux sélectifs ont permis de calculer l'efficacité de rencontre entre les deux levures (ou ‘mating’) grâce à la formule suivante :

$$\text{Efficacité de mating} = \frac{\text{Nombre de clones diploïdes (cfu/ml)}}{\text{Nombre de partenaires limitant (cfu/ml)}} * 100$$

où

Nombre de clones diploïdes = (Nombre de colonies présentes sur la boîte de dilution SD/-Trp/-Leu)/Volume de levures déposé sur boîte (en ml)) x facteur de dilution.

et

Nombre de partenaires limitant (correspond soit à l'appât, soit à la proie) = (Nombre de colonies présentes sur la boîte de dilution SD/-Trp ou SD/-Leu)/Volume de levures déposé sur boîte (en ml)) x facteur de dilution.

Il est impératif qu'au minimum un million de cellules de levure diploïdes soient criblées afin de détecter de vraies interactions sur le milieu de sélection SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/Aba. Le reste de la suspension de levures diploïdes a été étalée sur du milieu SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/Aba (**Annexe 8**) et incubée pendant 3 jours à 30°C. Seules les colonies bleues poussant sur le milieu avec l'aurobasidine présentent une interaction entre les protéines appâts et proies, du fait de l'activation de l'expression des gènes rapporteurs *MEL1* et *AURI-C* respectivement.

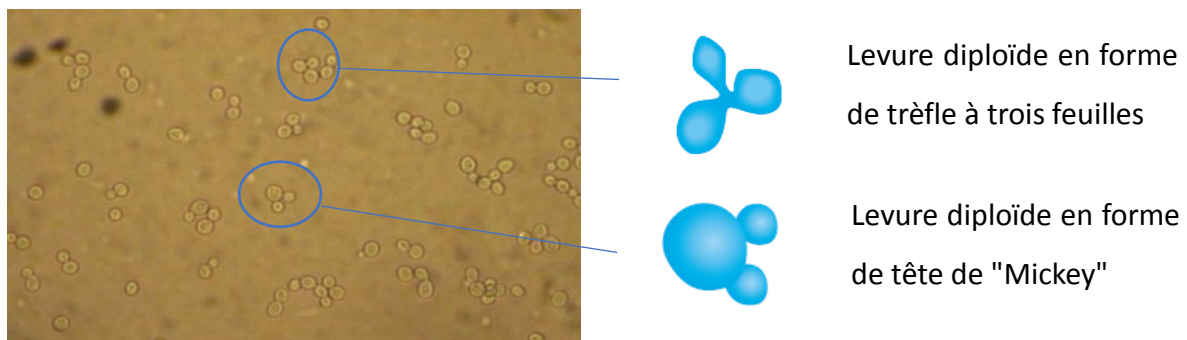


Figure 51 – Souches de levures diploïdes issues de la rencontre entre les souches haploïdes Y187 et Y2HGold

La photo a été prise avec un microscope à contraste de phase (x400).

2.2.8. Présence des plasmides pGADT7-Rec et pGBKT7 dans les levures correspondantes

La présence de la construction pGADT7-Rec/proie dans la souche Y187 et de la construction pGBKT7/cassiicoline dans la souche Y2HGold a été vérifiée par PCR à l'aide des couples d'amorces pGAD-S/pGAD-AS et Y2H-Cas-F1/Y2H-Cas1-R1, respectivement (**Annexe 3**). Des colonies de levures ont été choisies au hasard sur leurs milieux de culture respectifs (**Annexe 8**). Les réactions d'amplification ont été effectuées à l'aide d'un thermocycleur BioRad (Hercules, CA, USA) à partir d'une colonie de levure diluée dans 10 µl d'eau ultrapure à l'aide du kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) et 200 nM d'amorces. Le profil thermique utilisé était : 2 min à 95°C suivi de 35 cycles à 95°C pendant 30 sec, 60°C pendant 30 sec et 72°C pendant 45 sec, et enfin 5 min à 72°C. Les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1,2% (TAE 0,5X) additionné de Sybr Safe (0,1 µg/ml) puis séquencés à l'aide des amorces correspondantes.

2.2.9. Elimination des faux positifs par repiquages successifs

Afin d'éliminer le plus de faux positifs possible, les colonies diploïdes ayant poussées sur du milieu SD/-Trp/-Leu/X-α-Gal/Aba ont été repiquées individuellement sur des **milieux de plus en plus sélectifs** (**Annexe 8**) puis incubées 3 jours à 30°C :

- Milieu SD/-Trp/-Leu/-Adé/-His/X-α-Gal/Aba (**QDO/X/A**) : permet de sélectionner les colonies dans lesquelles tous les gènes rapporteurs ont été activés suite à l'interaction entre l'appât et une protéine proie.
- Milieu QDO/X/A + **1 mM** 3-AminoTriazol (**3-AT**) : le 3-AT est tout d'abord ajouté en faible concentration. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif de *HIS3* (un des gènes rapporteurs). Les cellules de levures seront capables de pousser seulement si l'expression du gène *HIS3* est suffisante pour maintenir l'effet inhibiteur du 3-AT.
- Milieu QDO/X/A + **10 mM** 3-AminoTriazol (**3-AT**) : ne sélectionne que les interactions fortes.

2.3. Résultats

Afin d'identifier chez l'hévéa des **facteurs de sensibilité** conduisant au phénomène de compatibilité et donc à la maladie, les **interacteurs protéiques de la cassiicoline Cas1** ont été recherchés en utilisant l'approche **double hybride en levure**. Le domaine correspondant à la cassiicoline mature a été utilisé comme appât pour cribler une banque d'expression du clone sensible PB260 inoculé par la souche CCP servant alors de proies.

Pour mener à bien cette étude, nous avons (i) vérifié le bon fonctionnement de la technique de double hybride pour pouvoir (ii) cribler le banque ADNc afin (iii) d'identifier les protéines proies interagissant la cassiicoline Cas1.

2.3.1. Contrôle du bon déroulement de la technique de double hybride en levure

Plusieurs conditions, décrites dans la partie "matériels et méthodes" (sous-partie 2.2), doivent être respectées afin de s'assurer de la réussite de la technique de double hybride en levures.

Contrôle du 'mating'

Afin que la cassiicoline (protéine appât) interagisse physiquement avec une des protéines proies issue de la banque ADNc, les souches de levure haploïdes Y187 et Y2HGold doivent fusionner pour former une cellule diploïde (**mating**). L'**efficacité** de cette rencontre est calculée comme décrit dans la partie 2.2.7, en prenant en compte le nombre de colonies haploïdes et diploïdes obtenues sur leurs milieux de culture respectifs (**Annexe 8**). Dans notre cas, le partenaire limitant de la rencontre est la souche Y187 contenant la proie ($7,7 \times 10^6$ cfu/ml). L'efficacité de 'mating' est alors de **6,4%**. Ce qui est un peu au-dessus de ce que le protocole Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech, Mountain View, CA, USA) prévoit (entre 2 et 5%). Cette efficacité de 'mating' élevée est favorable pour l'obtention de clones positifs.

Tableau 13 – Efficacité de 'mating' entre les souches Y187 et Y2HGold transformées avec les plasmides recombinants correspondants

	Milieu sélectif	Concentration (cfu/ml)	Efficacité de 'mating'
Haploïdes (proie)	SD/-Leu	$7,7 \times 10^6$	
Haploïdes (appât)	SD/-Trp	$2,4 \times 10^7$	6,4%
Diploïdes	SD/-Leu/-Trp	$4,9 \times 10^5$	

Le nombre de cfu/ml des différentes levures a été calculé selon la formule décrite dans la partie 2.2.7. Il correspond à chaque fois à la moyenne des différentes dilutions (1/10, 1/100 et 1/1000). L'efficacité de 'mating' (exprimé en pourcentage) a été calculée en divisant la concentration en levures diploïdes.

Vérification de la présence des plasmides dans les colonies de levures haploïdes

La présence des constructions **pGADT7-Rec/proie** dans la souche Y187 et de **pGBKT7/appât** dans la souche Y2HGold a été vérifiée par **PCR** à l'aide des amorces correspondantes (**Figure 52**). La **Figure 52-A** montre que sept colonies Y187 prélevées au hasard sur du milieu sélectif SD/-Leu ont toutes intégré une copie du plasmide, chacune avec un ADNc de taille différente, allant de 400 à 3 000 pb. L'amplification de la construction appât (**Figure 52-B**) montre des amplicons de taille attendue (113 pb) pour les deux colonies Y2HGold prélevées au hasard sur du milieu sélectif SD/-Trp. Ces deux colonies de levures ont donc été transformées avec succès avec la construction plasmidique correspondante et l'insert d'intérêt est présent à chaque fois.

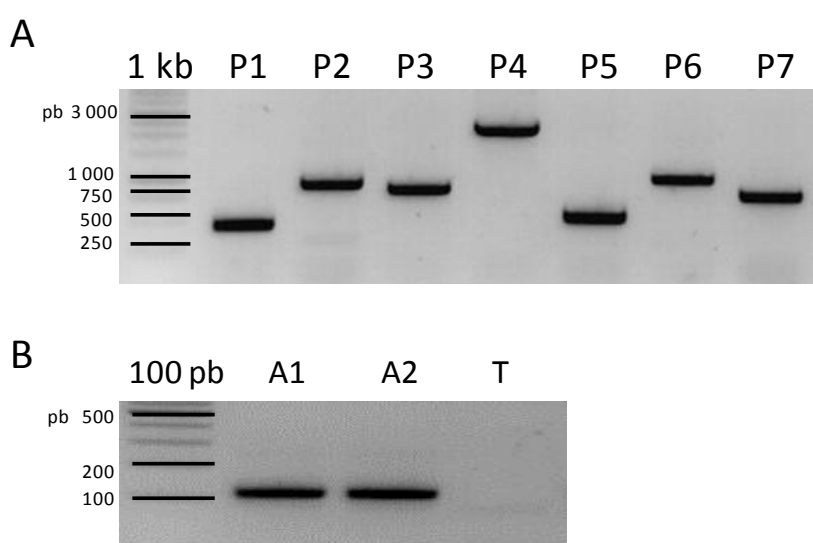


Figure 52 – Vérification de la présence des proies et appâts dans les souches de levure correspondantes

A, Sept souches de levures haploïdes Y187 choisies au hasard (P1 à P7), contenant chacune une construction pGADT7-Rec/proie, ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces pGAD-AS et pGAD-S (**Annexe 3**).

B, Deux souches de levures haploïdes Y2HGold choisies au hasard (A1 et A2), contenant la construction pGBKT7/cassiicoline, ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces Y2H-Cas1-F1 et Y2H-Cas1-R1 (**Annexe 3**). L'échantillon T correspond à l'amplification du plasmide pGBKT7 vide.

Les échantillons ont été analysés sur un gel d'agarose 1.2% (TAE 0.5X) et ont été révélés grâce au Sybr Safe (0,1 µg/ml).

Tests d'auto-activation et de toxicité

Afin de vérifier si la **cassiicoline n'active pas de manière autonome les gènes rapporteurs** en absence de protéine proie, des souches de levures Y2HGold, transformées avec la construction pGBKT7/cassiicoline, ont été étalées sur du milieu SD/-Trp (SDO) additionné de X-α-Gal (X) avec ou sans Auréobasidine (A) (**Tableau 14** et **Annexe 8**). Les colonies ayant poussé sur le milieu SDO/X apparaissent blanches alors qu'aucune colonie n'a poussé sur le milieu SDO/X/A. Ceci démontre que l'appât n'auto-active pas les gènes rapporteurs *MEL1* et *AUR1-C*.

Afin de vérifier que la **cassiicoline n'est pas toxique** quand elle s'exprime dans la levure, des souches Y2HGold ont été transformées avec le vecteur pGBKT7 contenant ou non l'insert, et ont été étalées sur milieu SDO (**Tableau 14** et **Annexe 8**). Que la levure produise ou non l'appât, les colonies apparaissent blanches et sont de tailles identiques (environ 2 mm). Ceci signifie que la cassiicoline n'est pas toxique pour la levure.

Tableau 14 – Résultats des tests d'auto-activation et de toxicité de la protéine appât

Test	Construction	Milieu de culture	Colonie (taille)	Couleur
Auto-activation	pGBKT7-cassiicoline	SD/-Trp	Oui (2 mm)	Blanche
	pGBKT7-cassiicoline	SD/-Tr	Oui (2 mm)	Blanche
	pGBKT7-cassiicoline	SD/-Trp/X/A	Non	/
Toxicité	pGBKT7-cassiicoline	SD/-Trp	Oui (2 mm)	Blanche
	pGBKT7 vide	SD/-Trp	Oui (2 mm)	Blanche

X, X- α -Gal et A, Auréobasidine

Ainsi, toutes ces vérifications nécessaires au bon déroulement de la technique de double hybride en levure garantissent l'obtention optimale de vrais clones diploïdes positifs (efficacité de 'mating' et test d'auto-activation), dont la croissance n'est pas impactée par la cassiicoline (test de toxicité) et dont la présence d'inserts (interacteurs potentiels) a été vérifiée par PCR.

2.3.2. Criblage de la banque ADNc PB260

A l'issue du 'mating', **1 380 colonies diploïdes bleues** ont été obtenues sur le milieu sélectif SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/Aba (DDO/X/A). Ce milieu permet de sélectionner les levures pour lesquelles l'expression des gènes rapporteurs *MEL1* (X- α -Gal) et *AURI-C* (Aba) a été activée. Des repiquages successifs sur du milieu SD/-Trp/-Leu/-Adé/-His/X- α -Gal/Aba (QDO/X/A), et sur du milieu QDO/X/A additionné de 1 mM puis 10 mM de 3-AT ont permis d'**éliminer 934 colonies**. Les **446 levures** ainsi sélectionnées expriment les quatre gènes rapporteurs (*MEL1*, *AURI-C*, *ADE2* et *HIS3*) et présentent une forte interaction entre l'appât et la proie. Leurs inserts ont été amplifiés par PCR à l'aide des amorces pGAD-S et pGAD-AS (**Annexe 3**) et déposés sur gel agarose 1,2% (TAE 0,5X) additionné de Sybr Safe (0,1 μ g/ml). Pour presque la moitié des colonies (**213**), **aucun plasmide proie** n'a été détecté (absence de bande sur le gel). Pour **35 autres colonies**, au moins **deux produits d'amplification** de taille différentes ont été observés évoquant la présence d'au moins deux plasmides pGADT7-Rec contenant chacun un insert proie différent.

Les **198 colonies** restantes ne présentaient qu'**un seul plasmide** (un seul produit d'amplification). Leur insert amplifié par PCR a été séquencé afin de connaître la nature de la protéine proie. Les séquences ADNc ont été alignées sur la base de données protéique "nr" de NCBI à l'aide du logiciel Blast2GO version 5.2.0. Puis, pour vérifier si la protéine produite dans la levure est bien la même que celle prédite par NCBI, le cadre de lecture de chaque séquence ADN a été vérifiée à l'aide du logiciel Geneious Pro v10.2.3. Pour cela, la séquence protéique de chaque candidat a été déduite à partir du codon start présent dans le plasmide pGADT7-Rec (**Annexe 9**). Ainsi, **122** séquences présentaient un **cadre de lecture décalé** par rapport au codon start et **29** autres ne présentaient **aucune homologie de séquence** sur les bases de données publiques. Pour ces dernières, les cadres de lecture n'ont donc pas pu être vérifiés. Elles ont été mises de côté, dans l'attente d'une meilleure identification. Sur les **48 séquences** présentant un bon cadre de lecture, **16** ont été retrouvées dans plusieurs levures (redondant). Il s'agit de protéines portant le même nom mais dont les séquences ADN et/ou protéiques diffèrent légèrement (familles multigéniques). La **Figure 53** reprend les différents résultats obtenus pour le criblage de la banque ADNc.

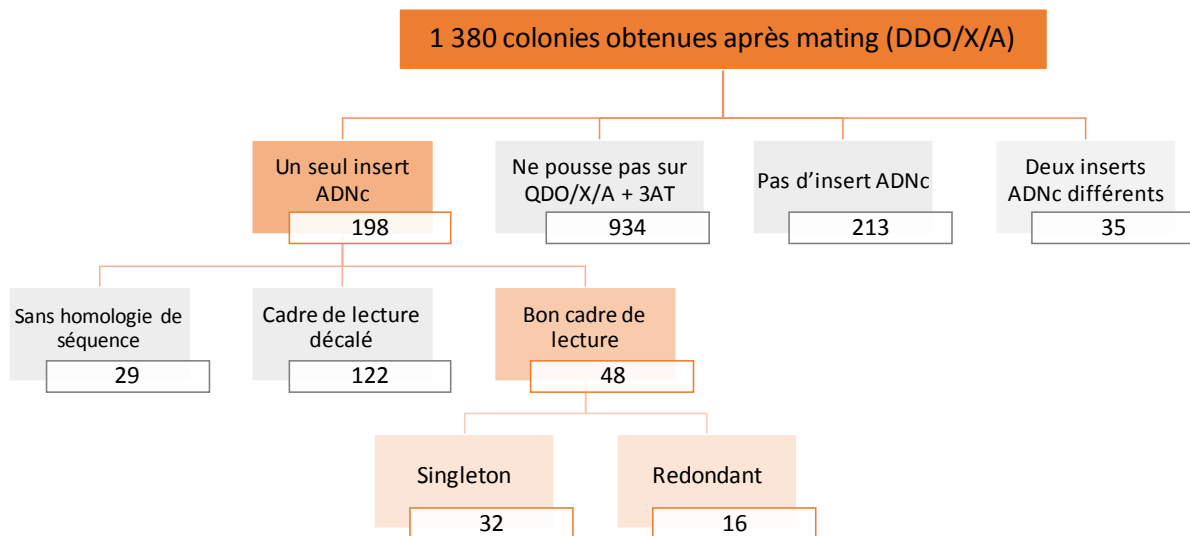


Figure 53 – Schéma récapitulatif du criblage de la banque ADNc codant les protéines proies interagtrices de la cassiicoline

A l'issue de la rencontre entre les souches Y187 (banque ADNc-proie) et Y2HGold (cassiicoline-appât), 1 380 colonies ont été obtenues sur du milieu DDO/X/A. Suite aux repiquages successifs sur du milieu QDO/X/A + 10 mM 3-AT, 934 colonies ont été éliminées. Des réactions PCR ciblant les proies ont permis d'écartier 213 colonies ne présentant pas d'insert proie et 35 colonies présentant au moins deux inserts proies. Sur les 198 colonies de levure possédant un seul insert proie (en orange) et donc codant potentiellement une protéine interagissant avec la cassiicoline, 29 d'entre elles étaient sans homologie de séquences (cadre de lecture inconnu), 122 avaient un cadre de lecture décalé et 48 présentaient un bon cadre de lecture dont 32 retrouvées une seule fois (singleton) et 16 retrouvées au moins dans deux levures différentes (redondant).

2.3.3. Identification des protéines proies interactrices

Le criblage de la banque ADNc a permis d'identifier 32 protéines d'hévéa différentes interagissant potentiellement avec la cassiocoline Cas1, dont 11 identifiées plusieurs fois (de 2 à 5 fois). Nous avons classé ces protéines en six catégories selon leur fonction potentielle dans le règne végétal (**Tableau 15**).

Tableau 15 – Protéines proies candidates issues du criblage de la banque d'ADNc des feuilles PB260 inoculées par CCP

L'identité des protéines prédites a été analysée par Blastp (NCBI). Les numéros d'accension des protéines prédites ont été indiqués entre parenthèses. L'occurrence correspond au nombre de colonies de levures dans lesquelles la protéine prédite a été retrouvée.

Protéines prédites (numéro d'accension)	Occurrence
Défense contre les pathogènes	
▪ Pro-hevein (XP_021650930 ; CAB62537)	5
▪ Subtilisin-like protease (XP_021638895)	1
▪ SWI/SNF complex component SNF12 (XP_021691833)	1
▪ chromatin structure-remodeling complex protein SYD (XP_021639152)	1
▪ Phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein (XP_021650125)	1
▪ Aldo-keto reductase family 4 member C10-like (XP_021672712)	1
▪ Synaptotagmin-2 (XP_021668075)	1
▪ LURP-one-related 5-like (XP_021672457)	1
Organisation de la paroi végétale, métabolisme des lipides et des sucres	
▪ 36.4 kDa proline-rich protein (XP_021685923)	3
▪ Aldose 1-epimerase (XP_021689531 ; XP_021634025)	3
▪ Hydroxyproline-rich glycoprotein (AAF40442)	2
▪ Pectate lyase (XP_021691023 ; XP_021648160)	2
▪ Beta-D-xylosidase (XP_021637053)	2
▪ Galactinol--raffinose galactosyltransferase (XP_021664571 ; XP_021664568)	2
▪ BAHG acyltransferase DCR (XP_021676766)	1
▪ Beta-galactosidase (XP_021658934)	1
▪ Trigalactosyldiacylglycerol 3 (XP_021682948)	1
▪ Phosphoglucosyltransferase, chloroplastic (XP_021637090)	1
▪ Omega-6 fatty acid desaturase (XP_021678117)	1
Mort cellulaire programmée et turn-over des protéines	
▪ Chaperone protein dnaJ A6 (AAD12055 ; XP_021649616)	3
▪ Luminal binding protein (BiP) (Q03681)	2
▪ B2 protein (XP_012489486 ; XP_021665173)	2
▪ E3 ubiquitin-protein ligase SINAT5-like (XP_021638117)	1
▪ Polyubiquitin (CAB81074)	1
Métabolisme des acides nucléiques et autres métabolismes	
▪ 2-isopropylmalate synthase (XP_021679551)	2
▪ tRNA (guanine(37)-N(1))-methyltransferase (XP_021675889)	1
▪ DNA polymerase eta (XP_021677033)	1
▪ Zinc finger protein ZAT11-like (XP_021642098)	1
▪ 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA thioesterase (XP_021651797)	1
▪ Alcohol dehydrogenase-like (XP_021647347)	1
▪ Molybdenum cofactor sulfurtransferase (XP_021676591)	1
▪ Ribosomal protein L2 (YP_004327703)	1

La technique du double hybride en levure engendrant beaucoup de **faux positifs**, on peut supposer que les protéines retrouvées plusieurs fois ont plus de chance d'être de vrais interacteurs que celles retrouvées une seule fois. C'est le cas de la pro-hévéine qui a été retrouvée dans cinq colonies de levures dont quatre contenant des inserts parfaitement identiques, et une cinquième différente. Il y aurait donc potentiellement deux pro-hévéines différentes interagissant avec Cas1. De la même manière, les protéines candidates '36.4 kDa proline-rich protein', 'aldose 1-epimerase' et 'chaperone protein dnaJ A6' ont toutes été retrouvées trois fois, mais toujours sous deux isoformes possibles (substitution d'au moins un acide aminé) ; les deux protéines '2-isopropylmalate synthase' sont strictement identiques alors que toutes les autres protéines redondantes ('hydroxyproline-rich glycoprotein', 'pectate lyase', 'beta-D-xylosidase', 'galactinol-sucrose galactosyltransferase', 'luminal binding protein' et 'B2 protein') sont différentes, partageant au minimum 90% d'identité de séquence.

Dans les paragraphes suivants, nous donnerons des informations sur chaque candidat protéique en prenant les catégories du **Tableau 15** une à une.

Protéines impliquées dans la défense contre les pathogènes

Cette catégorie contient entre autres des protéines à activité anti-fongique appartenant à la famille des AMPs (Anti-Microbial Peptides) telles que la pro-hévéine ou la 'phosphatidylglycerol-phosphatidylinositol transfer protein'. Les hévéines et hévéines-like, maturées à partir d'un précurseur appelé **pro-hévéine**, sont des petites protéines riches en cystéines présentes abondamment dans les lutoïdes du latex de l'hévéa (van Parijs *et al.*, 1991). Elles agiraient en ciblant les parois cellulaires des agents pathogènes (par l'intermédiaire d'un domaine de fixation à la chitine) qu'elles modifieraient, causant la mort du champignon (Berthelot *et al.*, 2016). L'hévéine rentre dans la catégorie des protéines PR (Pathogenesis-Related) de type 4 (van Parijs *et al.*, 1991; Soedjanaatmadja *et al.*, 1995; Berthelot *et al.*, 2016). Le candidat '**phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein**' appartient à la famille des 'Lipid Transfer Protein' (LTP) dont la première caractéristique est la capacité à se lier aux lipides et à les transférer entre les membranes. Les LTPs constituent la classe de protéines de type PR-14 (van Loon and van Strien, 1999). Elles peuvent inhiber la croissance de nombreux pathogènes fongiques tels que *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* ou encore *Verticillium dahliae* (Finkina *et al.*, 2016). Le mécanisme d'action de ces LTPs n'est pas entièrement connu. Néanmoins, la membrane cellulaire des pathogènes est considérée comme une cible potentielle pour l'action antimicrobienne des LTPs.

Les candidats '**chromatin structure-remodeling complex protein SYD**' et '**SWI/SNF complex component SNF12 homolog**' sont tous les deux impliqués dans le remodelage de la chromatine, pouvant être nécessaire pour l'expression des défenses de la plante. Walley *et al.*, (2008) ont montré que des mutants *syd* (SWI/SNF class chromatin remodeling ATPase SPLAYED) d'*A. thaliana*, présentaient une augmentation de la sensibilité au pathogène *Botrytis cinerea*. De même, la protéine **LURP** serait nécessaire pour la défense contre l'oomycète *Hyaloperonospora parasitica* chez *A. thaliana* (Knoth and Eulgem, 2008).

Les **aldo-keto reductases** interviennent dans de nombreux processus biologiques tels que la détoxification des aldéhydes, la biosynthèse des osmolytes, le métabolisme secondaire et le transport membranaire (Sengupta *et al.*, 2015). La **synaptotagmin-2** joue un rôle important dans la régulation du trafic de protéines du cytosol vers la matrice extracellulaire (Uchiyama *et al.*, 2014).

Les **subtilisine-like protéases** (ou **subtilases**) sont des protéases à sérines impliquées, entre autres, dans la résistance des plantes aux agents pathogènes (Figueiredo *et al.*, 2014 et 2018). Chez le coton par exemple, une subtilase appelée GbSBT1 serait associée à la résistance induite par le champignon héli-biotrophe *Verticillium dahliae* (Duan *et al.*, 2016). Ces auteurs ont montré par des techniques de "pull-down" et de double hybride que cette protéine interagissait physiquement avec une protéine de type prohibitine exprimée par le champignon durant l'infection. Ils ont émis l'hypothèse que cette interaction permettait d'activer la transcription de gènes de défense à *V. dahliae*.

Protéines impliquées dans l'organisation de la paroi végétale, dans le métabolisme des lipides et des sucres

Les candidats de ces trois catégories sont étroitement liés car ils peuvent agir comme des signaux déclenchant l'immunité suite à la pénétration du champignon à l'intérieur de la cellule.

La paroi végétale est la première ligne de défense active impliquée dans la protection contre les agents pathogènes. Parmi les interacteurs potentiels de la cassiicoline Cas1, les protéines **beta-D-xylosidase** et la **beta-galactosidase** appartiennent à la famille des glycosides hydrolases et sont impliquées dans l'assemblage et la réorganisation de la paroi végétale (Minic and Jouanin, 2006; Minic, 2008). Le candidat '**hydroxyproline-rich glycoprotein**' fait partie des protéines non enzymatiques associées à la paroi cellulaire végétale (CWPs). Il est classé en sous-famille comprenant entre autres des protéines riches en prolines (dont la '**36.4 kDa proline-rich protein**'). Ces protéines interviennent rapidement après l'invasion d'un agent pathogène en renforçant la paroi, stoppant ainsi sa progression au point d'entrée (Deepak *et al.*, 2010). Toujours en lien avec la paroi, le gène *PMR6* d'*A. thaliana* codant une **pectate lyase**, enzyme impliquée

dans la dégradation de pectine, est considéré comme un facteur de sensibilité (Vogel *et al.*, 2002). En effet, les auteurs ont montré qu'un mutant perte de fonction de ce gène confère la résistance au pathogène biotrophe *Golovinomyces cichoracearum*, responsable de l'oïdium. L'accumulation de pectine dans la matrice extracellulaire des parois végétales serait défavorable pour la pénétration du champignon. La paroi végétale est recouverte d'une couche protectrice appelée cuticule, composée de cires et cutines. Or, le candidat '**BAHD acyltransferase DCR**' est une enzyme de la voie de biosynthèse de la cutine (Shi and Aharoni, 2009).

Les candidats '**omega-6 fatty acid desaturase**' et '**trigalactosyldiacylglycerol 3**' sont liés au métabolisme des lipides mais n'interviennent pas directement dans l'organisation de la paroi végétale. Le premier intervient dans la synthèse des acides gras polyinsaturés, constituants importants des membranes plasmiques (Falcone *et al.*, 1994). Le deuxième est un transporteur ABC (ATP-binding cassette) transportant des lipides du réticulum endoplasmique vers les membranes chloroplastiques (Roston *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2007).

Les sucres non seulement fournissent de l'énergie aux cellules de la plante mais participent également aux défenses basales des plantes contre des agents pathogènes fongiques, en agissant en tant que molécule signal (Morkunas and Ratajczak, 2014). Parmi nos protéines candidates, la '**galactinol--sucrose galactosyltransferase**', est une CAZyme impliquée dans la synthèse du raffinose. Chez *A. thaliana*, le raffinose et son précurseur, le galactinol, agissent en tant que signal moléculaire endogène conférant la résistance contre le champignon pathogène *Botrytis cinerea* (Songmicho *et al.*, 2010). L'enzyme **phosphoglucomutase** participe au métabolisme (anabolisme et catabolisme) des sucres au niveau des chloroplastes (Hattenbach and Heineke, 1999). L'**aldose-1 épimérase** est impliquée dans le métabolisme des hexoses et catalyse l'interconversion des anomères alpha et bêta des sucres tels que le glucose et le galactose (Heese-Peck and Raikhel, 1998).

Protéines impliquées dans la mort cellulaire programmée et dans le turn-over des protéines

La **protéine chaperonne DnaJ** appartient à la grande famille des HSP (Heat Shock Protein), produites lors d'un stress biotique ou abiotique (Park and Seo, 2015). Egalement appelée HSP40, la DnaJ est très similaire à l'HSP70 '**luminal binding protein**' (**BiP**) avec laquelle elle peut interagir. Ces deux protéines ont été principalement étudiées dans diverses interactions impliquant des virus. Par exemple, dans le patho-système virus de la mosaïque du soja/soja, la surexpression d'une HSP40 induit l'immunité enclenchée par la mort cellulaire alors qu'une perte de fonction du gène codant cette protéine augmente la sensibilité au virus (Liu and Whitham, 2013). De plus, la chaperonne BiP cible les protéines mal repliées, destinées à être dégradées par le système ubiquitine/protéasome (Gupta and Tuteja, 2011). Deux candidats intervenant dans ce système apparaissent d'ailleurs dans notre liste de candidats : l'**ubiquitine E3 ligase** et la **polyubiquitine**.

Quant à la **protéine B2**, il semblerait qu'elle contienne un domaine DCD (Development and Cell Death) impliquée dans les interactions protéine-protéine, le développement et la mort cellulaire (Tenhaken *et al.*, 2005).

Protéines impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et autres métabolismes

D'autres candidats sont liés au métabolisme des acides nucléiques tels que l'enzyme '**DNA polymerase eta**' intervenant dans la réparation de l'ADN, l'enzyme '**tRNA (guanine(37)-N(1))-methyltransferase**' importante pour le maintien du bon cadre de lecture pendant la traduction et le candidat '**zinc finger protein ZAT11-like**' qui est un facteur de transcription.

Concernant les autres métabolismes, nous pouvons citer l'enzyme '**2-isopropylmalate synthase**' qui participe à la biosynthèse de la leucine (Lu *et al.*, 2014), la '**1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA thioesterase**' qui participe à la biosynthèse de la phylloquinone, jouant le rôle d'accepteur d'électrons au sein du photosystème I (Widhalm *et al.*, 2012), l'**alcool déshydrogénase** étant une enzyme qui catalyse la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol en utilisant du NADH, le candidat '**ribosomal protein L2**' qui est un constituant structurel des ribosome et l'enzyme '**molybdenum cofactor sulfurtransferase**' qui conduit à une accumulation d'acide abscissique et à une tolérance accrue à la sécheresse (Lu *et al.*, 2013).

Pour conclure, l'approche double hybride en levure nous a permis d'identifier une trentaine de protéines du clone PB260 qui pourraient interagir physiquement avec la cassiicoline Cas1. Cependant, cette approche génère souvent des faux positifs (fausses interactions) et il est nécessaire de confirmer l'interaction par d'autres techniques. Néanmoins, comme nous venons de le voir, beaucoup de ces protéines interviennent dans des mécanismes de défense, ce qui laisse espérer que ces interactions puissent avoir une interprétation biologique.

3. Approche transcriptomique : identification des gènes d'hévéa dont l'expression est modifiée par la cassiocoline Cas1 purifiée, comparativement chez PB260 (sensible) et RRIM600 (tolérant)





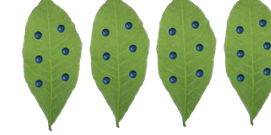
3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. Préparation des échantillons foliaires

Les clones d'hévéa **PB260** et **RRIM600** ont été cultivés en serre à Clermont-Ferrand (Université Clermont Auvergne, France), à la température de 28/26°C jour/nuit et avec un taux d'humidité compris entre 60 et 80%. Des feuilles au stade de développement C (Hallé and Martin, 1968) ont été prélevées et chaque foliole déposée face inférieure vers le haut dans une grande boîte en plastique transparente Nunc™ 245 x 245 mm (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA), sur une feuille de papier humide. Les traitements ont été appliqués en gouttes de 10 µl, à raison de 6 gouttes par foliole, après un grattage superficiel de l'épiderme (sur 1 mm²) à l'aide d'une lame de scalpel, comme décrit précédemment (Tran *et al.*, 2016). Deux folioles ont été traitées avec de la cassiocoline Cas1 purifiée à 1 ng/µl (TOX) et trois autres avec de l'eau ultrapure (CG pour contrôle gratté). Au moins quatre répétitions biologiques ont été réalisées, sur quatre plantes différentes. Au total, 20 échantillons foliaires par clone ont été utilisés pour cette étude (**Tableau 16**). Les folioles ont été incubées à 25°C dans le noir. Des disques foliaires de 2,2 cm² ont été prélevés autour de chaque goutte à l'aide d'un emporte-pièce, à différents temps d'incubation : 0h (prélèvement immédiatement après le dépôt, pour le traitement eau uniquement), 12h ou 24h. Pour chaque feuille, les disques ont été rassemblés par trois dans un même tube (deux tubes par feuille), congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'au broyage.

Tableau 16 – Echantillons utilisés pour l'analyse transcriptomique (PB260 et RRIM600)

Des feuilles des clones PB260 et RRIM600 ont été traités avec 1 ng/µl de cassiocoline purifiée (échantillons TOX pour toxine) pendant 12h ou 24h ou avec de l'eau purifiée (échantillons CG pour contrôle gratté) pendant 0h, 12h ou 24h après un léger grattage de l'épiderme inférieur. Chaque échantillon foliaire (R1 à R4) provient d'une plante différente.

Durée traitement	0h	12h	24h
● Toxine purifiée à 1 ng/µl (échantillons TOX)			
● Eau (échantillons CG)			
Répétition	R1 R2 R3 R4	R1 R2 R3 R4	R1 R2 R3 R4

3.1.2. Extraction d'ARNs totaux et séquençage

Les disques foliaires ont été broyés à l'azote liquide et les ARNs totaux extraits dans du tampon d'extraction CTAB selon le protocole décrit par Chang *et al.* (1993). Les banques ARN ont été préparées sur la plateforme GeT-PlaGe de **GenoToul** (INRA, Auzeville, France) à l'aide du kit Illumina TruSeq Stranded, puis séquencées sur un séquenceur haut-débit Illumina HiSeq3000. Les lectures ont été effectuées en 'paired-end' 2x150 pb avec la chimie HiSeq3000. La qualité du séquençage a été vérifiée à l'aide de l'outil FastQC (Andrews, 2010).

3.1.3. Nettoyage des données et 'mapping'

Le traitement des données RNA-Seq a été réalisé à l'aide d'un pipeline personnalisé (Philippe Label, UMR PIAF, Clermont-Ferrand), exécuté sur le cluster de calcul GenoToul. Le nettoyage des données brutes a été accompli selon les étapes suivantes : suppression des séquences correspondant aux adaptateurs (TagCleaner ; Schmieder *et al.*, 2010) ; élimination des motifs poly-A ou poly-T, des nucléotides anonymes (N) et des séquences trop courtes (< 60 pb) ; filtrage de la faible complexité et décontamination. Les N ont été éliminés de manière à ne conserver que la partie de la séquence sans N la plus longue. Le filtrage de la complexité est basé sur une compressibilité supérieure à 30% selon le ratio de compression de Lempel-Ziv-Welch (Welch, 1984). Les contaminants, c'est-à-dire tout ce qui ne correspond pas à notre cible (bactéries, virus, autres champignons, humain, etc), ont été éliminés à l'aide de l'outil BWA (Burrows-Wheeler Alignment) après alignement sur des séquences de référence (Li and Durbin, 2009). Enfin, les paires de séquences ont été reconstituées.

Les séquences ainsi nettoyées, décontaminées et appairées ont été alignées (mappées) à l'aide de BWA sur un **transcriptome** de référence d'hévéa dit **synthétique** car il rassemble deux transcriptomes différents délivrés par deux agents de l'UMR AGAP du CIRAD (Montpellier) : celui du clone PB260 (86 941 transcrits ; Montoro *et al.*, 2010) et celui du clone RRIM600 (34 572 transcrits ; Salgado *et al.*, 2014). Les ARNm totaux qui ont servi à constituer ces deux transcriptomes ont été isolés à partir de différents tissus (latex, feuille, écorce, racine) prélevés sur des plantes à différents stades de développement. Le transcriptome synthétique contient 114 076 transcrits, ce qui est inférieur à la somme des deux transcriptomes PB260 et RRIM600 car les transcrits en commun ont été éliminés (Fu *et al.*, 2012). Le 'mapping' permet d'obtenir un tableau de comptage des séquences alignées par transcrit et par échantillon. Il permet aussi de calculer un taux de 'mapping' par échantillon, calculé ainsi :

$$\frac{\text{nombre de séquences mappées}}{\text{nombre total de séquences}} \times 100$$

3.1.4. Analyse de l'expression différentielle des transcrits

Le tableau de comptage a été utilisé pour la détection des **gènes différentiellement exprimés (GDEs)** à l'aide du logiciel RStudio (version 1.1.423) en utilisant le package DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Le modèle statistique combinait le traitement (TOX ou CG), la durée du traitement (0, 12 ou 24h) et les répliques biologiques (R1 à R4). Les données ont été filtrées en éliminant les transcrits ayant un niveau d'expression nul dans tous les échantillons et ceux mal assemblés. En effet, dans le tableau de comptage chaque valeur de 'mapping' est associée à une valeur de bruit de fond. Ce bruit de fond signifie que le transcriptome de référence possède des transcrits de mauvaise qualité ou trop courts par rapport aux transcrits de l'échantillon, qui ne peuvent donc pas, ou partiellement, s'aligner sur les transcrits de référence. Au total, 14 338 et 15 104 transcrits ont été écartés de l'analyse pour les échantillons PB260 et RRIM600, respectivement. Puis les données de comptage ont été normalisées selon la méthode VST (Variance Stabilizing Transformation) pour réaliser une analyse en composante principale (ACP) à l'aide du package FactoMineR (Lê *et al.*, 2008; Husson *et al.*, 2016 ; version 1.41). L'analyse d'expression différentielle a été réalisée entre les conditions TOX et CG en prenant les durées de traitement deux à deux (TOX-12h vs CG-12h et TOX-24h vs CG-24h), pour chaque clone pris séparément (quatre analyses au total). Pour chaque analyse, la p-value a été ajustée de façon à contrôler le taux de faux-positifs (FDR pour False Discovery Rate ; Benjamini and Hochberg, 1995) à 1 au maximum par liste de transcrits différentiels. Le FDR était donc de 0,01 pour les analyses PB260-TOX12vsCG12 et RRIM600-TOX12vsCG12, de 0,001 pour l'analyse RRIM600-TOX24vsCG24 et de 0,0001 pour l'analyse PB260-TOX24vsCG24.

3.1.5. Annotation, 'heatmap' et enrichissement en 'Gene Ontology' (GO)

Les **fichiers d'annotation** des clones PB260 et RRIM600 ont été fournis avec leurs transcriptomes de références respectifs. Ils ont été fusionnés pour ne former qu'un seul fichier comportant 108 917 transcrits. Parmi ces transcrits, 52 318 sont associés à un terme de GO et 94 886 ont permis de déduire une séquence protéique par Blastx, dont la moitié (49 860) sont inconnus ('hypothetical protein' ou 'uncharacterized protein'). La **'heatmap'** a été construite à partir des valeurs de 'log2 fold change' (log-ratio des valeurs d'expression d'un gène dans deux conditions différentes) des quatre conditions citées précédemment en utilisant la fonction heatmap.2 du package gplot de RStudio (version 1.1.423). Le regroupement hiérarchique a été calculé à l'aide du package de base R en utilisant les distances euclidiennes et la méthode de Ward. Les **enrichissements en GO** ont été réalisés sur les GDEs des conditions prises deux à deux citées précédemment. Ces transcrits ont été extraits et comparés au transcriptome de référence pour déterminer s'ils sont sur-représentés dans le sous-ensemble étudié. La méthode du chi carré (khi2) a été utilisée pour comparer les abondances observées et attendues des transcrits, et les p-values ont été ajustées avec une correction de Benjamini-Yekutieli (FDR=0,01 ; Benjamini and Yekutieli, 2001).

3.2. Résultats

Afin d'expliquer les différences de sensibilité à la cassiicoline Cas1 observées entre les clones PB260 (sensible) et RRIM600 (tolérant), une analyse d'expression différentielle a été menée sur des échantillons foliaires traités ou non avec de la toxine purifiée, en utilisant une **approche transcriptomique** (RNA-Seq).

Pour mener à bien cette étude, nous avons tout d'abord vérifié les modalités de certains paramètres importants tels que (i) le taux de 'mapping' et (ii) la dispersion des échantillons en fonction des variables. Nous avons ensuite (iii) analysé le différentiel d'expression entre la condition traitée (toxine) et la condition témoin (eau) pour chaque clone afin de faire ressortir leurs différences. Puis, (iv) une analyse d'enrichissement en ontologie (GO) a permis de faire ressortir les fonctions biologiques majeures impactées par la toxine, communes aux clones PB260 et RRIM600 ou spécifiques de chaque clone. Nous avons également (v) analysé plus spécifiquement une famille de gènes candidats codant des protéines de type récepteur. Enfin, (vi) les interacteurs potentiels de Cas1 identifiés par double hybride ont été recherchés dans la liste des gènes différentiellement exprimés des deux clones.

3.2.1. Taux de 'mapping'

Afin de s'assurer de la **qualité de l'alignement** des 40 échantillons foliaires des clones PB260 et RRIM600 sur le transcriptome de référence synthétique, un **taux de 'mapping'** a été calculé comme décrit dans la partie 3.1.3 (**Tableau 17**). Pour chaque échantillon, il a été précisé le clone, le traitement, la durée du traitement, le nom de la répétition (Rép) et la date de séquençage. Les taux de 'mapping' des échantillons du clone PB260 sont compris entre 63% et 90% alors que ceux du clone RRIM600 sont compris entre 57% et 64%. Plus le taux est élevé et plus la banque de séquençage est bonne. Un faible taux de 'mapping' (inférieur à 50%) peut indiquer que certains transcrits sont présents dans les échantillons mais pas dans le transcriptome de référence (expression différentielle), ou que certains ARNs sont dégradés. Ces deux hypothèses peuvent expliquer les différences observées entre les deux clones. Les échantillons PB260 ont été séquencés en deux fois (2015 et 2017), il est alors possible que les ARNs de 2015 (taux moyen de 68%) soient de moins bonne qualité que ceux de 2017 (taux moyen de 89%). Pour RRIM600 (taux moyen de 60%), il est possible que de nombreux transcrits ne s'alignent pas sur le transcriptome synthétique car il contient deux fois plus de transcrits PB260 que de RRIM600. Néanmoins, les valeurs de 'mapping' sont suffisantes pour poursuivre l'étude transcriptomique.

Tableau 17 – Taux de ‘mapping’ des échantillons PB260 et RRIM600

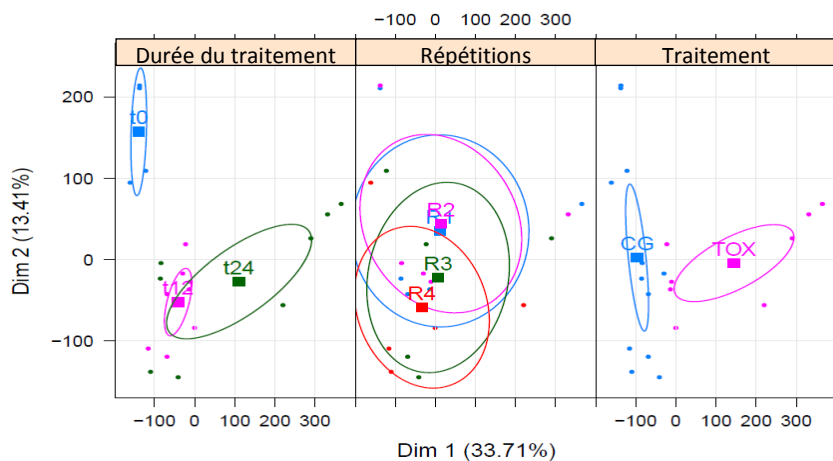
Pour chaque échantillon (N°), il est précisé le clone, le traitement appliqué (CG, contrôle gratté ou TOX, toxine purifiée Cas1), la durée du traitement exprimée en heures (0, 12 ou 24h), le nom de la répétition (Rép), la date de séquençage et le taux de ‘mapping’ (%).

N°	Clone	Traitement	Durée du traitement (h)	Rép	Date séquençage	Taux de ‘mapping’ (%)
1	PB260	CG	0	C1	2015	71
2	PB260	CG	0	C2	2015	71
3	PB260	CG	0	C3	2017	89
4	PB260	CG	0	C4	2017	89
5	PB260	CG	12	C1	2015	70
6	PB260	CG	12	C2	2015	70
7	PB260	CG	12	C3	2017	90
8	PB260	CG	12	C4	2017	89
9	PB260	CG	24	C1	2015	69
10	PB260	CG	24	C2	2015	69
11	PB260	CG	24	C3	2017	89
12	PB260	CG	24	C4	2017	89
13	PB260	TOX	12	T1	2015	63
14	PB260	TOX	12	T2	2015	68
15	PB260	TOX	12	T3	2015	68
16	PB260	TOX	12	T4	2017	89
17	PB260	TOX	24	T1	2015	64
18	PB260	TOX	24	T2	2015	66
19	PB260	TOX	24	T3	2015	67
20	PB260	TOX	24	T4	2017	87
21	RRIM600	CG	0	C1	2017	60
22	RRIM600	CG	0	C2	2017	63
23	RRIM600	CG	0	C3	2017	64
24	RRIM600	CG	0	C4	2017	63
25	RRIM600	CG	12	C1	2017	60
26	RRIM600	CG	12	C2	2017	59
27	RRIM600	CG	12	C3	2017	58
28	RRIM600	CG	12	C4	2017	60
29	RRIM600	CG	24	C1	2017	60
30	RRIM600	CG	24	C2	2017	60
31	RRIM600	CG	24	C3	2017	61
32	RRIM600	CG	24	C4	2017	62
33	RRIM600	TOX	12	T1	2017	57
34	RRIM600	TOX	12	T2	2017	58
35	RRIM600	TOX	12	T3	2017	58
36	RRIM600	TOX	12	T4	2017	57
37	RRIM600	TOX	24	T1	2017	60
38	RRIM600	TOX	24	T2	2017	59
39	RRIM600	TOX	24	T3	2017	59
40	RRIM600	TOX	24	T4	2017	59

3.2.2. Dispersion des échantillons en fonction des variables

Afin d'analyser le **regroupement des échantillons** les uns par rapport aux autres pour chaque variable, une **ACP** a été réalisée à partir du tableau de comptage normalisé (**Figure 54**). Plus les échantillons sont proches sur l'ACP et plus leur profil transcriptomique est proche également. Tout d'abord, nous pouvons constater que quel que soit le clone, il y a un **effet du traitement**. L'application de la toxine purifiée (TOX) même à faible concentration (1 ng/μl), modifie bien l'expression de certains gènes de l'hévéa comparativement au témoin (CG). De plus, nous pouvons observer un **effet de la durée du traitement**. Celui-ci est plus fort pour le clone RRIM600 car aucune ellipse de confiance ne se superpose. A l'inverse, les ellipses de confiance des temps t12 et t24 du clone PB260 se chevauchent, ce qui signifie qu'une partie des gènes s'exprimant à 12h, s'expriment aussi à 24h. Enfin, les **répétitions biologiques** du clone PB260 sont proches sur l'ACP alors que l'échantillon R4 de RRIM600 est différent des autres (ellipse de confiance décalée). Cet échantillon a été écarté de l'analyse.

PB260



RRIM600

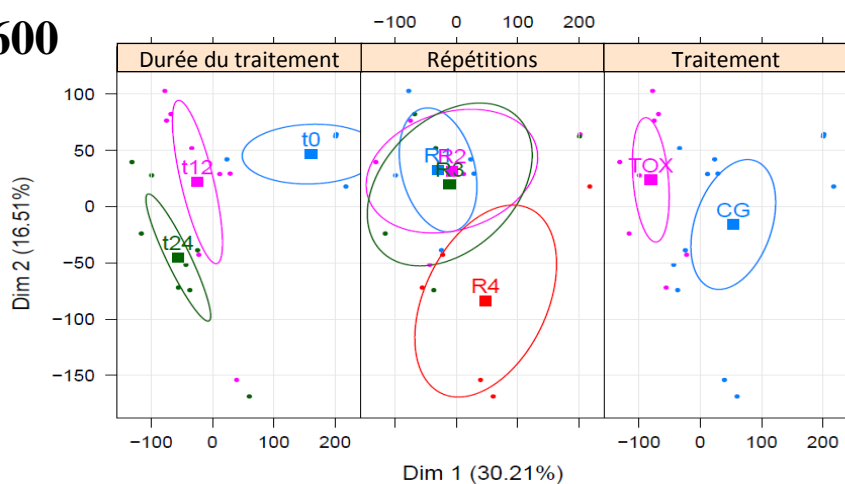


Figure 54 – ACP montrant le regroupement des échantillons des clones PB260 (haut) et RRIM600 (bas) en fonction des variables ‘durée du traitement’, ‘répétitions’ et ‘traitement’. Au sein des différentes variables, chaque modalité, (t0, t12, t24, R1, R2, R3, R4, CG et TOX) est représentée par quatre points correspond à quatre échantillons différents. Pour chaque modalité, les ellipses de confiance à 95% ont été indiquées.

3.2.3. Gènes différentiellement exprimés (GDEs) en réponse à la cassiocoline Cas1 purifiée

Le **différentiel d'expression** entre les conditions TOX (toxine Cas1 purifiée) et CG (contrôle gratté) a été analysé pour chaque clone en prenant les durées de traitement deux à deux (TOX-12h vs CG-12h et TOX-24h vs CG-24h).

MA-plot

Afin d'illustrer la distribution des GDEs dans les différentes conditions citées précédemment, un MA-plot a été réalisé (**Figure 55**).

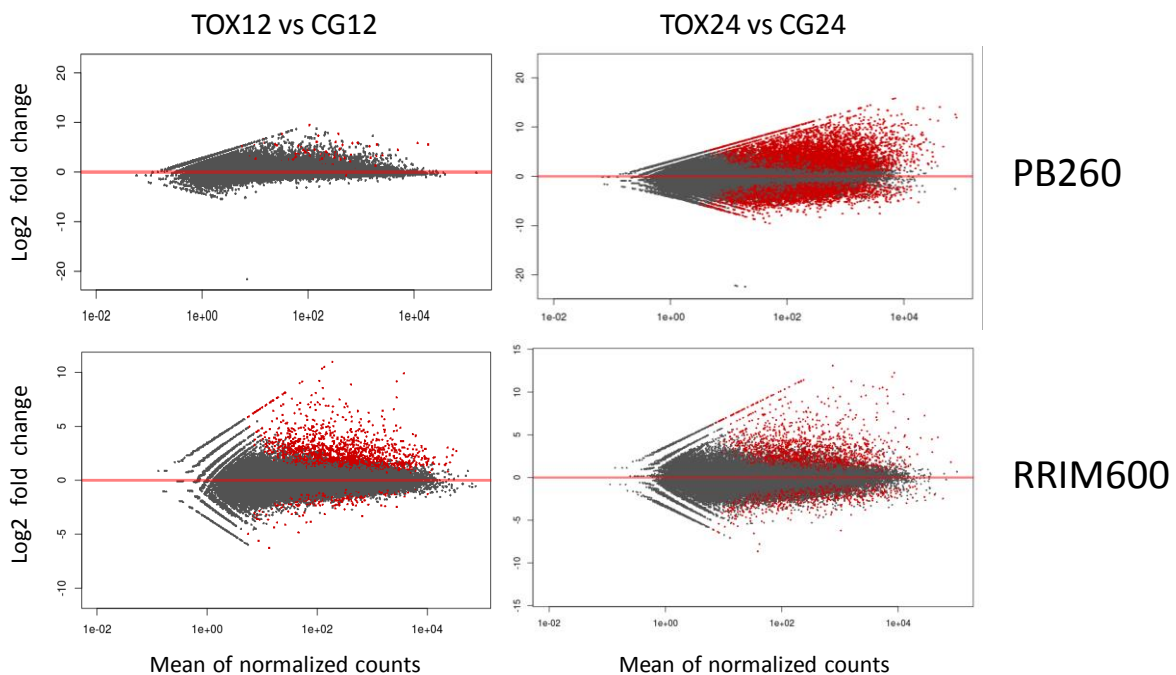


Figure 55 – MA-plot montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés 12h et 24h après l'application de la cassiocoline Cas1 chez deux clones d'hévéa (PB260 et RRIM600)

Quatre conditions ont été analysées : PB260-TOX12vsCG12, PB260-TOX24vsCG24, RRIM600-TOX12vsCG12 et RRIM600-TOX24vsCG24. Chaque MA-plot représente le différentiel d'expression (log₂ fold change) en fonction des niveaux moyens d'expression de chaque gène normalisé (mean of normalized counts). Chaque point représente un transcrite différentiellement exprimé (rouge) ou non-différentiellement exprimés (gris).

Pour les échantillons du **clone PB260**, on observe cent trente-six fois plus de GDEs à **24h (17 411)** qu'à **12h (128)** parmi les 99 738 transcrits du transcriptome synthétique restant après filtrage. L'application de la toxine a par ailleurs activé plus de gènes qu'elle n'en a réprimé : 120 et 9 483 gènes sur-exprimés contre 8 et 7 928 gènes sous-exprimés à 12 et 24h, respectivement. Le MA-plot montre également que les gènes sur-exprimés font partis des gènes les plus fortement exprimés (mean of normalized counts). Pour les échantillons du **clone RRIM600**, les différences entre 12h et 24h sont moins marquées. En effet, il y a **2 236** GDEs à **12h** (1 844 induits et 392

réprimés) contre **3 294** à **24h** (2 031 induits et 1 263 réprimés) parmi les 114 076 transcrits du transcriptome synthétique. Au contraire de PB260, le nombre de gènes fortement induits et fortement réprimés est assez équilibré. Si l'on **compare les clones entre eux**, nous constatons que chez RRIM600 les réponses sont plus rapides (2 236 GDEs dès 12h) mais assez stables entre les deux temps de cinétique (3 294 GDEs à 24h). Pour PB260, les réponses sont plus tardives (seulement 128 GDEs à 12h) mais beaucoup plus fortes à 24h (17 411 GDEs).

'Heatmap'

Afin de visualiser les GDEs obtenus entre les conditions traitées par la toxine (TOX) ou non (CG) à 12h et 24h, pour les clones PB260 et RRIM600, une 'heatmap' a été générée à partir des valeurs de 'log2 fold change' de 12 737 transcrits (**Figure 56**). Les transcrits avec des 'log2 fold change' compris entre -2 et 2 ont été écartés de l'analyse pour ne considérer que les GDEs présentant les plus forts différentiels d'expression.

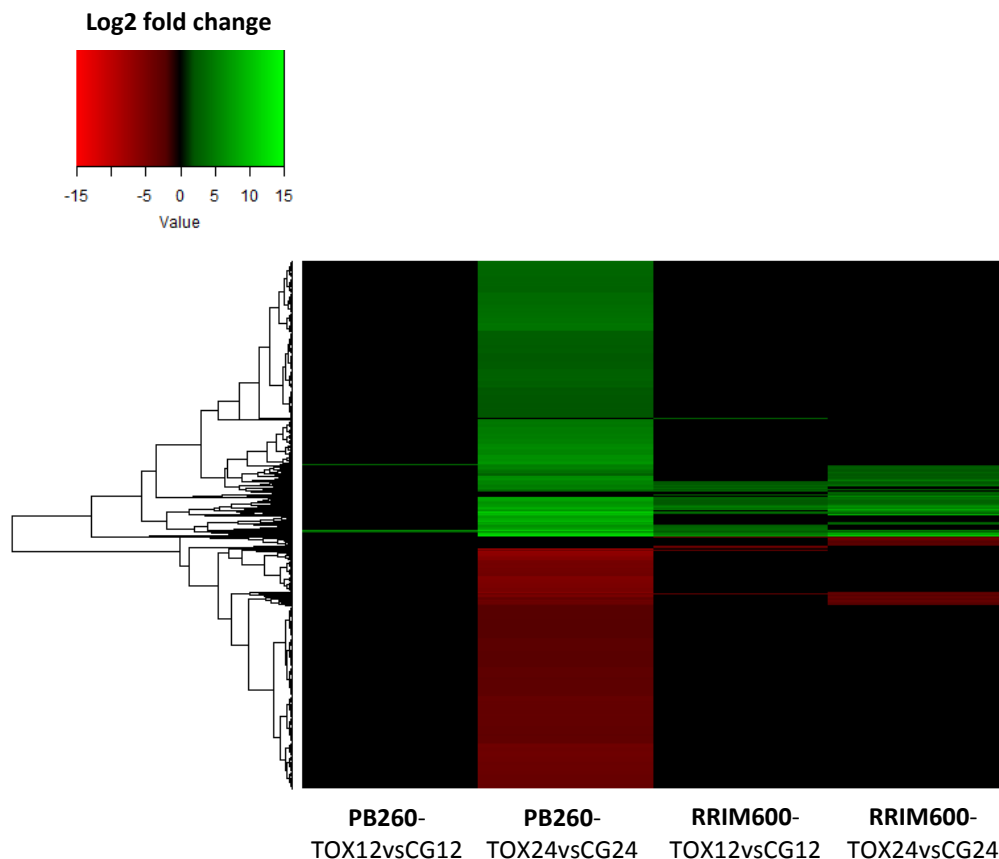


Figure 56 – Expression différentielle des gènes des clones PB260 et RRIM600 en réponse à la toxine Cas1 purifiée

La 'heatmap' a été générée avec les valeurs de 'log2 fold change' issues des analyses différentielles suivantes : PB260-TOX12vsCG12, PB260-TOX24vsCG24, RRIM600-TOX12vsCG12 et RRIM600-TOX24vsCG24, où TOX correspond à la toxine et CG au contrôle gratté. Le dendrogramme à gauche représente le regroupement des transcrits en utilisant une mesure de distance euclidienne. Les couleurs rouges, noires et vertes indiquent une sous-expression, une expression non différentielle et une sur-expression des gènes, respectivement.

Comme observé précédemment, le nombre de GDEs est beaucoup plus important dans la condition PB260-TOX24_{vs}CG24 que dans toutes les autres conditions. C'est pour cette raison que nous observons autant de gènes non différentiellement exprimés sur la 'heatmap' (représentés en noir).

Les quelques GDEs à 12h chez PB260 sont également différentiellement exprimés à 24h, alors que ce n'est pas le cas pour RRIM600. Chez ce dernier, 971 gènes sont transitoirement exprimés à 12h (dont 708 induits et 263 réprimés) et 2 019 gènes ne sont exprimés que 24h après l'application de la toxine purifiée (dont 897 induits et 1 122 réprimés). Ce qui nous donne respectivement 1 049 et 263 gènes induits et réprimés communs entre 12h et 24h

Sur les quelques GDEs commun aux deux clones et aux deux durées de traitements, les profils d'expression sont similaires. Ceux induits ou réprimés chez un clone le sont également chez l'autre et ceux induits ou réprimés à 12h le sont aussi à 24h. Il n'y a qu'un seul cas pour le clone RRIM600 où un gène est réprimé à 12h mais induit à 24h. Il s'agit d'un gène (CL1Contig19300) codant l'enzyme 'flavanone 3-dioxygénase', impliquée dans la synthèse de flavonoïdes.

D'après ces résultats, nous avons décidé qu'il serait plus informatif d'analyser les GDEs différents entre les deux clones plutôt que ceux qui sont communs, et qu'il n'est plus nécessaire d'analyser les durées de traitement séparément. **Dans la suite du document, les GDEs à 12h et 24h seront traités conjointement.**

Diagramme de Venn

Afin de **lister** les GDEs **communs** et **spécifiques** de PB260 et de RRIM600, un **diagramme de Venn** a été dessiné, en séparant les gènes induits des réprimés (**Figure 57**). Pour rappel, les transcrits exprimés à 12h et à 24h ont été combinés pour chaque clone.

De manière surprenante, un gène apparaît à la fois induit et réprimé chez RRIM600. Ceci s'explique par le fait que pour chaque clone, les GDEs à 12h et à 24h ont été rassemblés. Or, ce gène correspond à celui identifié précédemment à l'aide de la 'heatmap' (CL1Contig19300), réprimé à 12h et sur-exprimé à 24h. De plus, un gène est réprimé chez PB260 et induit chez RRIM600. Il s'agit d'un gène (CL7065Contig1) codant une protéine 'ATP-binding' qui n'avait pas été identifié sur la 'heatmap' car présentant un 'log2 fold change' de -1,42.

Sur les 16 837 GDEs du clone PB260 et les 4 127 GDEs du clone RRIM600, 3 165 sont communs (dont 853 réprimés et 2 312 induits). Ce qui donne 620 gènes réprimés et 342 gènes induits par la cassiicoline qui sont GDEs seulement chez RRIM600 contre 6 952 réprimés et 6 720 induits seulement chez PB260.

Une analyse d'enrichissement ontologique a été effectuée sur les six principaux compartiments du diagramme de Venn.

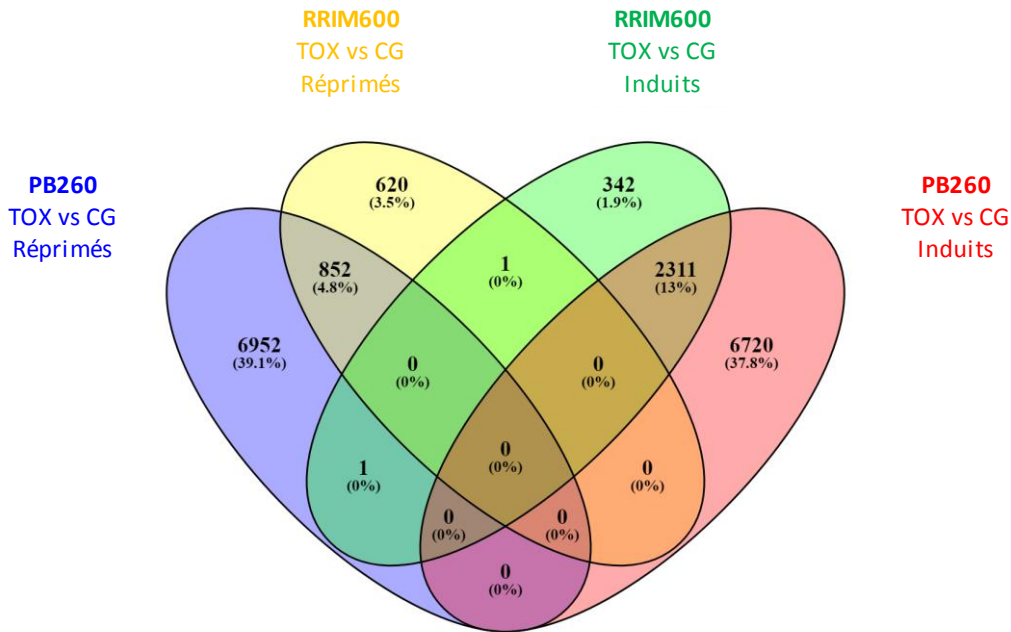


Figure 57 – Diagramme de Venn montrant les GDEs communs aux deux clones et spécifiques

Les listes des GDEs ont été obtenues en comparant les conditions TOX (toxine) et CG (contrôle gratté). Pour cette analyse, les transcrits s’exprimant à 12h et 24h ont été combinés pour chaque clone. Les gènes induits (en vert pour RRIM600, en rouge pour PB260) et réprimés (en jaune pour RRIM600, en bleu pour PB260) ont été séparés. Le diagramme a été dessiné en ligne à l’aide de l’outil VENNY (Version 2.1 ; Venny Oliveros, 2007).

3.2.4. Analyse de l'enrichissement ontologique des GDEs

Pour chaque clone, les **ontologies** (GO) des GDEs entre les conditions TOX et CG ont été soumises à trois analyses d'enrichissement afin de faire ressortir les fonctions biologiques impactées par la cassiocoline. La première analyse porte sur les GDES communs aux deux clones (**Figure 58**) et les deux autres portent sur les GDEs spécifiques des clones PB260 (**Figure 59**) et RRIM600 (**Figure 60**). Pour chaque analyse, les transcrits exprimés à 12h et à 24h ont été combinés, les gènes induits et réprimés ont été séparés et les dix termes de GO les plus abondants des trois catégories (Processus Biologique, Compartiment Cellulaire et Fonction Moléculaire) ont été représentés.

3.2.4.1. Enrichissement en GO sur les GDEs communs

La **Figure 58** présente les résultats d’enrichissement pour les **GDEs communs** aux deux clones. Concernant les GDEs **sur-exprimés** (**Figure 58-A**), la catégorie ‘Processus Biologique’ montre une forte implication des gènes impliqués dans les **réponses de défense**, avec certains termes de GO assez explicites : ‘defense response to fungus’ (GO:0050832) et ‘response to biotic stimulus’ (GO:0009607). Les processus impliquant les diterpénoïdes (GO:0016101), terpénoïdes (GO:0016114) et L-phenylalanine (précurseur des flavonoïdes entre autres, GO:0006558)

présentent un grand intérêt en raison de leur large éventail d'activités biologiques telles que des activités anti-microbiennes et anti-fongiques (Singh and Sharma, 2015).

Dans la catégorie 'Fonction Moléculaire', comme précédemment dans la catégorie 'Processus Biologique', de nombreux GDEs sont associés aux modifications de la paroi et de la membrane plasmique dont ceux impliquant des chitinases (GO:0006032, GO:0004568 et GO:0008061) permettant à la plante de se protéger contre les attaques fongiques en dégradant leur paroi constituée de chitine (van Loon *et al.*, 2006). La chitinase est une PR protéine (van Loon *et al.*, 2006; Sels *et al.*, 2008 ; **Tableau 1**) déclenchée par les PAMPs. Les termes GO les plus abondants de cette catégorie, 'ammonia-lyase activity' (GO:0016841) et 'carbon-nitrogen lyase activity' (GO:0016840), font intervenir la phenylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme clé dans la voie des phénylpropanoïde (Bowles, 1990). Les produits de cette voie biochimique, comprenant des composés phénoliques, des flavonoïdes et la lignine, sont impliqués dans les mécanismes de résistance aux maladie (Vogt, 2010; La Camera *et al.*, 2004).

Les termes GO de la catégorie 'Compartiment Cellulaire' montrent que la plupart des GDEs induits sont localisés au niveau des membranes (GO:0048046, GO:0016021 et GO:0016020), un des premiers sites d'interaction entre un agent pathogène et une cellule végétale, après la paroi des cellules végétales et l'apoplasme.

Concernant les GDEs **réprimés** (**Figure 58-B**), la catégorie 'Processus Biologique' montre qu'ils sont impliqués majoritairement dans le processus de **photosynthèse** : 'photosynthesis, light harvesting' (GO:0009765), 'photosynthesis' (GO:0015979), 'photosynthesis, dark reaction' (GO:0019685), 'organic substance metabolic process' (GO:0071704) et 'hexose metabolic process' (GO:0019318). Les dix GDEs les plus abondants sont d'ailleurs tous associés aux chloroplastes (voir 'Compartiment Cellulaire'). Les termes de GO les plus abondants de la catégorie 'Fonction Moléculaire' sont également liés à la photosynthèse. Par exemple, les tétrapyrroles (GO:0046906) sont des constituants de la chlorophylle, les décarboxylases (GO:0016831) telles que la RuBisCo sont des enzymes réalisant une décarboxylation et les peroxydases (GO:0004601) interviennent en détoxifiant l'eau oxygénée issue de la photo-respiration.

Ainsi, l'application de la cassiicoline purifiée sur les feuilles des clones PB260 et RRIM600 exercent dans les deux cas les mêmes fonctions de défenses : induction de gènes codant des molécules du métabolisme secondaire (terpénoïdes, PAL) ou des enzymes hydrolytiques (chitinase), et altération de la photosynthèse.

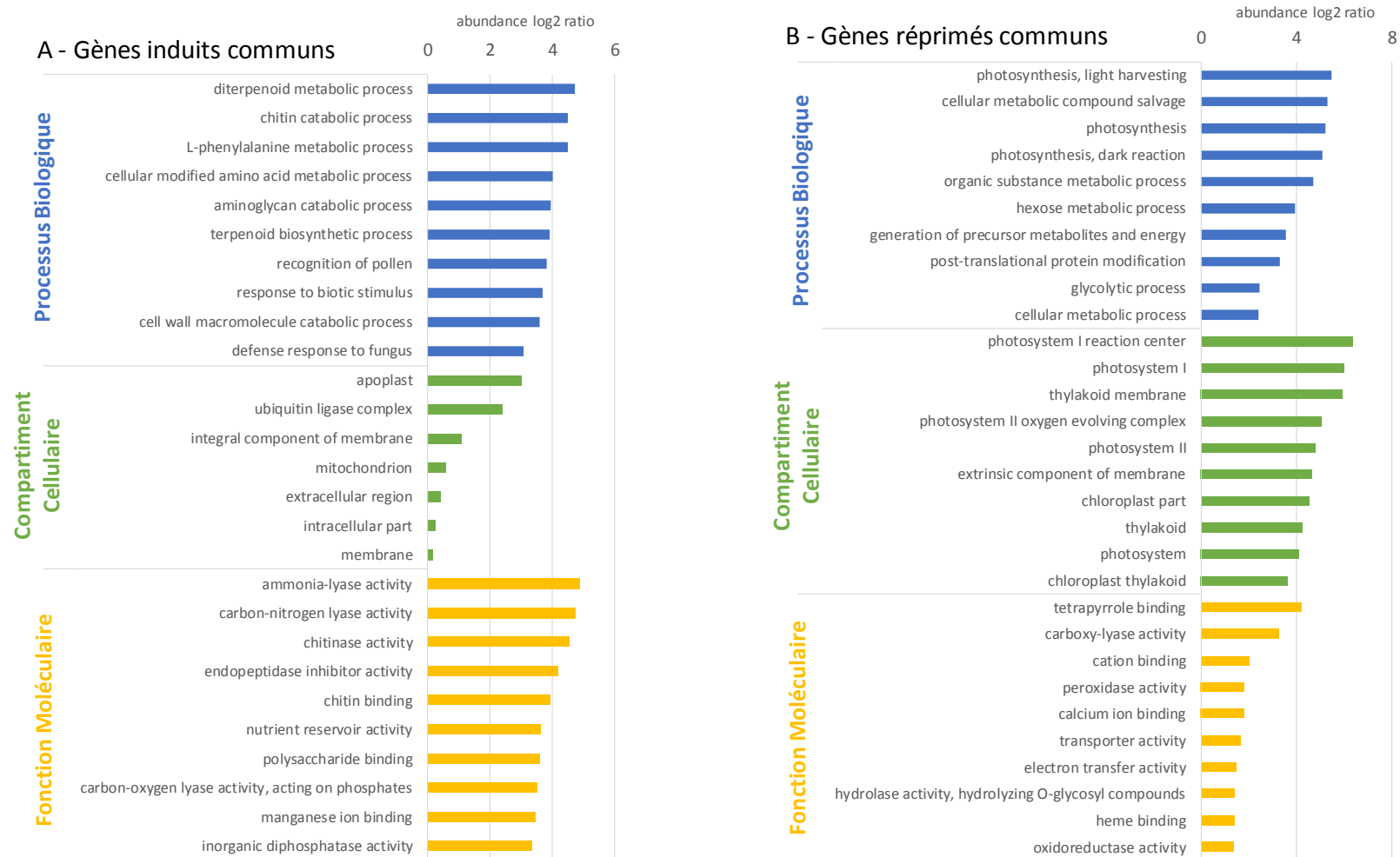


Figure 58 – Classement des termes de GO les plus représentés parmi les GDEs communs aux clones PB260 et RRIM600

L'analyse de l'enrichissement ontologique a été effectuée séparément pour les transcrits sur-exprimés (A) et sous-exprimés (B) dans la condition TOX par rapport à la condition CG (temps 12 et 24h combinés). Les catégories de GO identifiées, 'Processus Biologique' (en bleu), 'Compartiment Cellulaire' (en vert) et 'Fonction Moléculaire' (en jaune) étaient significativement sur-représentés ($p < 0,05$) dans les différents jeux de données. L'abundance log2 ratio correspond à l'abundance en log2 du ratio du nombre de transcrits de notre échantillonnage sur le nombre de transcrits du transcriptome de référence. Seuls les dix premiers termes GO sur-représentés de chaque catégorie sont montrés.

3.2.4.2. Enrichissement ontologique des GDEs spécifiques de chaque clone

Pour essayer de comprendre la différence de sensibilité des deux clones à la cassiicoline, l'enrichissement ontologique a été analysé sur les **GDEs spécifiques** de PB260 (**Figure 59**) et de RRIM600 (**Figure 60**).

Parmi les GDES spécifiques de PB260 **sur-exprimés** (**Figure 59-A**), les termes de 'Processus Biologique' concernant le métabolisme de la méthionine sont sur-représentés, avec en première position le 'S-adenosylmethionine metabolic process' (GO:0006556), suggérant une augmentation de la synthèse de l'éthylène, hormone de signalisation des stress biotiques et abiotiques. La méthionine est par ailleurs impliquée dans la biosynthèse des **polyamines** ('polyamine biosynthetic process', GO:0006596) telles que la **spermidine** ('spermidine biosynthetic process', GO:0008295) et la **spermine** ('spermine biosynthetic process', GO:0006597), qui sont des métabolites secondaires synthétisés lors d'une infection par un pathogène. Chez le coton par exemple, les spermines ont été corrélées à la résistance au champignon nécrotrophe *Verticillium dahliae* (Mo *et al.*, 2015). De plus, la présence de ces protéines favorise l'accumulation de la phytoalexine camalexine via la sur-expression de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et de cytochromes P450 chez le coton et chez *A. thaliana* (Mo *et al.*, 2015b). Les MAPK participent à la cascade de signalisation permettant la réponse immunitaire. Les termes GO de la catégorie 'Fonction Moléculaire' : 'nucleobase-containing compound kinase activity' (GO:0019205), 'protein serine/threonine phosphatase activity' (GO:0004722) et 'protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway' (GO:0007205) sont d'ailleurs sur-représentés.

On retrouve également des processus communs aux deux clones (bien que les GDEs soient spécifiques de chaque clone) comme ceux impliqués dans la synthèse d'**acides aminés aromatiques** (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) : 'aromatic amino acid family biosynthetic process' (GO:0009073) dans 'Processus Biologique' et '3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase activity' (GO:0003849) dans 'Fonction Moléculaire'. Alors que d'autres termes de GO tels que 'chloride transport' (GO:0006821), 'TOR signaling' (GO:0031929), 'protein translocase activity' (GO:0015450) et 'copper-transporting ATPase activity' (GO:0043682) mettent en avant les **transports** transmembranaires (plasmalemmes ou endomembranes).

Les termes de GO de la catégorie 'Compartiment Cellulaire' sont très variés mais impliquent principalement la membrane plasmique ('membrane-bounded periplasmic space', GO:0030288), la membrane mitochondriale ('TIM23 mitochondrial import inner membrane translocase complex' et GO:0005744 ; 'mitochondrial inner membrane', GO:0005743), et le réticulum endoplasmique ('intrinsic component of endoplasmic reticulum membrane', GO:0031227 ; 'endoplasmic reticulum part', GO:0044432 et 'endoplasmic reticulum', GO:0005783).

Les GDEs **réprimés** spécifiques de PB260 (**Figure 59-B**) appartiennent essentiellement aux mêmes processus que ceux communs aux deux clones. Comme précédemment, c'est la **machinerie photosynthétique** qui est perturbée par l'application de la toxine : 'chlorophyll biosynthetic process' (GO:0015995), 'carotenoid biosynthetic process' (GO:0016117), 'photosynthesis, light harvesting' (GO:0009765) et 'photosynthesis' (GO:0015979) concernant les processus biologiques ; 'photosystem II oxygen evolving complex' (GO:0009654), 'photosystem II' (GO:0009523), 'photosynthetic membrane' (GO:0034357), 'photosystem' (GO:0009521), 'chloroplast stroma' (GO:0009570) et 'chloroplast thylakoid' (GO:0009534) pour la catégorie 'Compartiment Cellulaire' ; 'sigma factor activity' (GO:0016987) pour la catégorie 'Fonction Moléculaire'. Les GDEs réprimés impliqués dans la voie de signalisation de l'auxine représentent le deuxième groupe le plus sur-représentés de la catégorie 'Processus Biologique'. D'après Llorente *et al.* (2008), la répression de cette voie chez *A. thaliana* augmenterait la sensibilité aux pathogènes nécrotrophes *Plectosphaerella cucumerina* et *Botrytis cinerea*.

Les GDEs **spécifiques de RRIM600** sont peu nombreux puisque d'une part le nombre de total de GDEs de RRIM600 est dix à vingt fois inférieur à celui de PB260, et d'autre part, la plupart sont communs aux deux clones (**Figure 58**). L'analyse de leur enrichissement ontologique (**Figure 60**) révèle plusieurs grandes catégories de processus biologiques parmi les GDEs **induits** comme parmi les **réprimés** : oxydo-réduction (GO:0055114, GO:0016706, GO:0016705 et GO:0016491), métabolisme de sucres (GO:0005975), transport (GO:0055085, GO:0006810 et GO:0005215), phosphorylation des protéines (GO:000646 et GO:0004713) et régulation de la transcription (GO:0006355). Au total, la plupart des GDEs sont responsables des processus fondamentaux associés à la régulation biologique et au métabolisme. Étonnamment, les termes GO 'defense response' (GO:0006952) et 'response to stress' (GO:0006950) sont sur-représentés parmi les GDEs réprimés.

Ainsi, il est difficile d'identifier précisément ce qui différencie les deux clones en termes d'ontologie de gènes. Dans les deux cas, les GDEs indiquent que la plante se défend contre l'agresseur.



Figure 59 – Classement des termes de GO les plus représentés parmi les GDEs trouvés seulement chez le clone sensible PB260

L'analyse de l'enrichissement ontologique a été effectuée séparément pour les transcrits sur-exprimés (A) et sous-exprimés (B) dans la condition TOX par rapport à la condition CG (temps 12 et 24h combinés). Les catégories de GO identifiées, 'Processus Biologique' (en bleu), 'Compartment Cellulaire' (en vert) et 'Fonction Moléculaire' (en jaune) étaient significativement sur-représentés ($p < 0,05$) dans les différents jeux de donnés. L'abundance log2 ratio correspond à l'abundance en log2 du ratio du nombre de transcrits de notre échantillonnage sur le nombre de transcrits du transcriptome de référence. Seuls les dix premiers termes GO de chaque catégorie sont montrés.

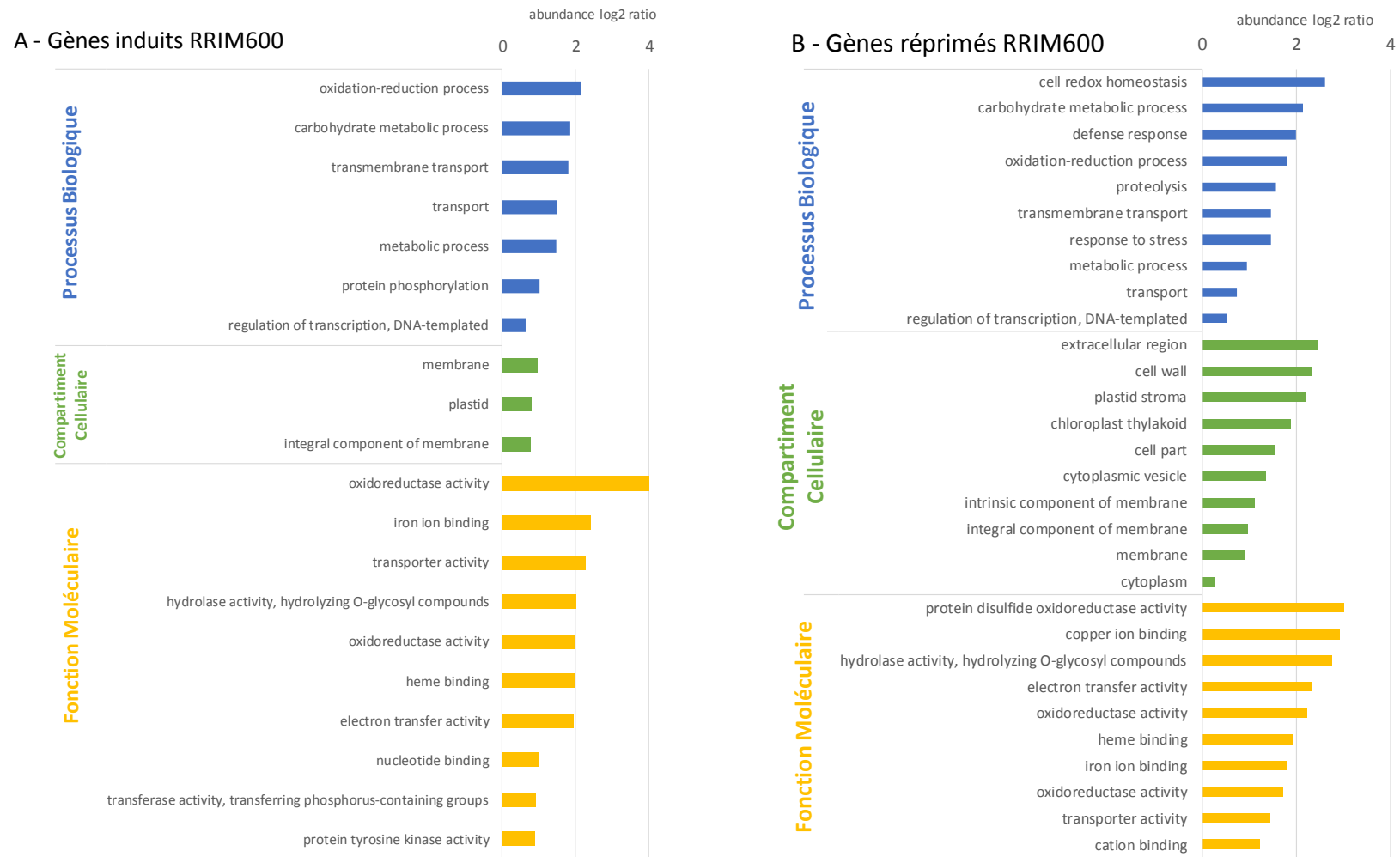


Figure 60 – Classement des termes de GO les plus représentés parmi les GDEs trouvés seulement chez le clone sensible RRM600

L'analyse de l'enrichissement ontologique a été effectuée séparément pour les transcrits sur-exprimés (A) et sous-exprimés (B) dans la condition TOX par rapport à la condition CG (temps 12 et 24h combinés). Les catégories de GO identifiées, 'Processus Biologique' (en bleu), 'Compartiment Cellulaire' (en vert) et 'Fonction Moléculaire' (en jaune) étaient significativement sur-représentés ($p < 0,05$) dans les différents jeux de données. L'abondance log2 ratio correspond à l'abondance en log2 du ratio du nombre de transcrits de notre échantillonnage sur le nombre de transcrits du transcriptome de référence. Seuls les dix premiers termes GO de chaque catégorie sont montrés.

3.2.5. Analyse des GDEs codant des protéines de type récepteur

Pour essayer d'**identifier** un potentiel **récepteur** de la **cassiicoline** capable d'expliquer l'intensité de la réponse transcriptionnelle observée chez PB260 comparativement à RRIM600, nous nous sommes intéressés à l'ensemble des DEGs de type **RLK** (Receptor-Like Kinase, **Tableau 18 et 19**) et **NBS-LRR** (Nucleotide-Binding Site – Leucine-Rich Repeat, **Tableau 20**). Les RLKs localisés à la surface des cellules interviennent dans la perception des PAMPs et dans l'induction de la PTI. Une répression de ces gènes serait dans ce cas favorable au champignon alors qu'une sur-expression serait bénéfique pour la plante. D'autre part, certains récepteurs RLK peuvent intervenir lors du second niveau d'immunité et déclencher une réaction hypersensible se manifestant par une mort cellulaire programmée, défavorable aux champignons biotrophes (ETI) mais favorable aux champignons ayant une phase nécrotrophe ou saprotrophe (NETS). Dans ce dernier cas, une répression de ces gènes est favorable pour la plante alors qu'une sur-expression conduit à la maladie. Les récepteurs NBS-LRR quant à eux interviennent seulement dans des interactions spécifiques avec des effecteurs. Cette reconnaissance déclenche également des réactions de type ETI ou NETS.

Chez le clone sensible **PB260**, 80 transcrits identifiés comme des 'lrr receptor-like serine threonine-protein kinase' sont différenciellement exprimés (dont 35 induits et 45 réprimés) 24h après application de la cassiicoline Cas1 purifiée (**Tableau 18**). Qu'ils soient induits ou réprimés, les niveaux d'expression basale de ces gènes (mean CG) et leurs niveaux après le traitement toxine (mean TOX) sont très variables (de 0 à 13 051). De la même manière, les 'log2fc' sont assez forts allant de -5,98 à 7,76. De plus, il y a presque autant de gènes induits que réprimés. De ce fait, il est difficile de savoir si la modification de l'expression de ces gènes est favorable ou non pour le champignon.

Concernant le clone tolérant **RRIM600**, seulement six transcrits appartenant à cette catégorie de récepteurs étaient différenciellement exprimés 12h et 24h après application de la cassiicoline Cas1 purifiée (**Tableau 19**). Au contraire de PB260, les réponses sont plus rapides. Dès 12h, un gène est induit (CL4139Contig2) et un autre est réprimé (CL7974Contig1). Il est possible que ce soit ce décalage de réponse qui explique les différences de sensibilité entre les deux clones. Seulement, les 'log2fc' sont très faibles (sauf pour CL7974Contig1). La tolérance du clone RRIM600 n'est peut-être pas liée à l'activation/répression de ces récepteurs mais à un autre mécanisme.

Les récepteurs de type NBS-LRR sont les plus connus parmi les protéines R. Aucun de ces récepteurs ne fait partie de la liste de GDEs pour le clone RRIM600 alors que trois d'entre eux étaient différenciellement exprimés chez le clone PB260 dont un sur-exprimé et deux sous-exprimés (**Tableau 20**). Malgré un faible 'log2fc' (1,36), l'induction d'un NBS-LRR chez le clone sensible pourrait expliquer la différence de sensibilité observée entre les deux clones.

Tableau 18 – Gènes induits (vert) et réprimés (rouge) chez le clone PB260 en réponse à la cassioline, identifiés comme étant des ‘Irr receptor-like serine threonine-protein kinase’

Induits					Réprimés				
ID	log2fc	pajd	Mean CG	Mean TOX	ID	log2fc	pajd	Mean CG	Mean TOX
CL14702Contig1	7,76	6,27E-10	0,0	52,8	CL13202Contig1	-5,98	5,21E-05	8,0	0,0
CL19429Contig1	5,39	1,46E-10	4,8	246,8	CL7426Contig2	-5,60	1,38E-06	33,8	0,5
CL1090Contig1	3,93	5,27E-18	41,5	641,5	CL3501Contig1	-4,99	4,37E-05	11,3	0,3
CL17591Contig1	3,91	1,19E-06	1,5	26,0	CL1282Contig2	-4,84	8,56E-14	137,5	4,5
CL17148Contig1	3,74	3,21E-09	8,5	103,3	CL16768Contig1	-4,81	7,04E-09	83,0	3,0
CL8546Contig1	3,60	1,07E-08	36,0	447,8	CL541Contig5	-4,78	3,87E-08	67,5	2,3
CL13772Contig1	3,56	9,51E-07	15,3	174,0	CL1Contig16418	-4,72	4,93E-05	132,5	5,3
CL23018Contig1	3,47	2,84E-07	54,5	589,0	CL17075Contig1	-4,53	1,44E-05	87,8	4,0
CL20764Contig1	3,07	5,33E-12	12,0	115,5	CL18646Contig1	-4,47	1,57E-06	29,3	1,3
CL1Contig9021	3,05	4,76E-07	1 579	13 051	CL1282Contig1	-4,42	2,36E-09	123,8	5,8
CL20735Contig1	2,98	2,17E-15	21,8	174,0	CL17323Contig1	-3,92	2,62E-06	26,3	1,5
CL28246Contig1	2,96	5,72E-05	4,3	33,5	CL4049Contig1	-3,89	1,65E-06	41,5	2,8
CL12484Contig1	2,88	7,36E-05	4,0	28,3	CL2021Contig1	-3,76	5,02E-05	33,0	2,3
CL16506Contig1	2,87	9,28E-09	14,5	106,5	CL12925Contig1	-3,74	1,06E-08	126,8	9,8
CL8925Contig1	2,67	3,22E-24	43,3	275,0	CL541Contig6	-3,73	6,40E-09	251,3	19,3
CL1Contig18993	2,51	3,10E-05	591,5	3 385	CL14758Contig1	-3,68	9,97E-05	21,8	1,8
CL18985Contig1	2,51	3,81E-05	11,5	63,8	CL541Contig4	-3,67	6,81E-05	72,8	5,5
CL6182Contig1	2,43	4,92E-11	55,8	308,8	CL20955Contig1	-3,63	9,21E-05	13,5	1,0
CL1Contig3414	2,42	3,03E-05	60,3	333,3	CL11730Contig1	-3,63	1,25E-06	17,3	1,5
CL1Contig2686	2,38	1,03E-06	147,0	776,8	CL1Contig6290	-3,54	2,08E-06	32,0	2,8
CL9358Contig1	2,36	2,76E-13	146,0	738,5	CL23220Contig1	-3,52	1,09E-10	77,5	7,0
CL9857Contig2	2,01	1,47E-11	193,8	791,0	CL2397Contig2	-3,46	1,01E-10	85,3	7,5
CL11961Contig1	1,95	2,77E-05	23,8	91,0	CL2225Contig3	-3,35	2,20E-05	22,3	2,0
CL6371Contig2	1,91	2,17E-08	34,8	120,5	CL2397Contig1	-3,25	1,76E-15	182,3	19,0
CL5086Contig2	1,91	3,10E-31	246,5	928,0	CL8397Contig2	-3,12	1,07E-06	45,3	5,3
CL16745Contig1	1,90	2,53E-09	33,0	128,0	CL17157Contig1	-3,09	1,22E-10	84,0	10,3
CL15782Contig1	1,82	3,44E-07	20,5	76,3	CL9497Contig3	-3,09	2,13E-09	105,5	12,3
CL1Contig320	1,77	2,27E-05	79,5	274,0	CL16868Contig1	-3,06	7,45E-05	45,5	5,8
CL15285Contig1	1,75	1,52E-06	37,8	127,8	CL12643Contig1	-3,03	5,33E-08	55,8	7,0
CL15739Contig1	1,73	9,87E-09	77,5	259,5	CL8315Contig1	-2,83	2,64E-06	212,3	30,0
CL383Contig3	1,64	2,37E-10	408,3	1 281,8	CL1979Contig3	-2,83	2,41E-12	277,5	39,5
CL10498Contig1	1,61	1,47E-13	202,8	622,0	CL1Contig908	-2,83	2,58E-06	19,3	2,8
CL2634Contig3	1,51	9,27E-08	43,3	119,5	CL1622Contig2	-2,82	4,81E-07	103,5	14,8
CL450Contig8	1,11	5,95E-06	853,8	1 843,5	CL9810Contig1	-2,79	7,55E-08	377,3	54,5
CL4262Contig2	1,03	2,55E-08	494,3	1 000,3	CL13626Contig1	-2,70	1,56E-07	169,0	26,0
					CL11346Contig1	-2,69	4,72E-05	485,8	75,8
					CL13334Contig1	-2,52	6,48E-08	60,0	10,3
					CL5041Contig1	-2,51	3,06E-07	54,0	9,8
					CL14731Contig1	-2,47	5,62E-05	346,5	63,3
					CL3915Contig3	-2,38	6,00E-05	136,0	26,0
					CL10278Contig1	-2,31	1,11E-06	88,5	18,3
					CL4577Contig3	-2,31	1,89E-10	88,8	18,0
					CL2138Contig3	-2,28	3,15E-07	59,5	13,0
					CL3468Contig2	-2,26	5,17E-07	124,5	26,3
					CL4058Contig1	-2,23	9,08E-09	73,0	16,0

ID, identifiants des transcrits ; log2fc, log-ratio des valeurs d'expression des transcrits entre la condition traitée par la toxine (TOX) et la condition témoin (CG) ; pajd, p-value ajustée par le FDR ; meanTOX et meanCG, moyennes de comptage. Tous les transcrits sont différenciellement exprimés 24h après l'application de la toxine (mais pas à 12h).

Tableau 19 – Gènes induits (vert) et réprimés (rouge) chez le clone RRIM600 en réponse à la cassiicoline, identifiés comme étant des ‘lrr receptor-like serine threonine-protein kinase’

ID	GDEs	log2fc	padj	Mean CG	Mean TOX	Durée de traitement
CL4139Contig2	Induit	1,39	6,33E-03	203,3	532,7	12h
CL12887Contig1	Réprimé	-1,13	7,48E-05	506,3	232,0	24h
CL189Contig10	Réprimé	-1,36	1,80E-05	201,3	78,0	24h
CL2749Contig2	Réprimé	-1,65	7,28E-04	53,3	17,0	24h
CL13119Contig2	Réprimé	-1,73	4,87E-04	182,3	55,0	24h
CL7974Contig1	Réprimé	-5,62	1,91E-03	17,0	0,3	12h

ID, identifiants des transcrits ; GDEs, les gènes induits sont représentés en vert et les réprimés en rouge ; log2fc, log-ratio des valeurs d’expression des transcrits entre la condition traitée par la toxine (TOX) et la condition témoin (CG) ; padj, p-value ajustée par le FDR ; meanTOX et meanCG, moyennes de comptage.

Tableau 20 – Gènes induits et réprimés en réponse à la cassiicoline chez le clone PB260, identifiés comme étant des ‘NBS-LRR resistance protein’

ID	GDEs	log2fc	padj	Mean CG	Mean TOX
CL7866Contig2	Induit	1,36	1,74E-11	189,8	489,3
CL13430Contig1	Réprimé	-3,88	1,62E-19	117,0	8,0
CL1Contig18947	Réprimé	-1,34	2,63E-06	284,0	112,5

ID, identifiants des transcrits ; GDEs, les gènes induits sont représentés en vert et les réprimés en rouge ; log2fc, log-ratio des valeurs d’expression des transcrits entre la condition traitée par la toxine (TOX) et la condition témoin (CG) ; padj, p-value ajustée par le FDR ; meanTOX et meanCG, moyennes de comptage. Tous les transcrits sont différentiellement exprimés 24h après l’application de la toxine.

3.2.6. Candidats double hybride différentiellement exprimés

Les candidats interacteurs potentiels de la cassiicoline, issus de l’expérimentation double hybride, ont été recherchés dans les listes des GDEs PB260 (**Tableau 21**) et RRIM600 (**Tableau 22**) à 24h, en alignant les ADNc sur le transcriptome de référence synthétique à l’aide du logiciel Geneious Pro v10.2.3.

Parmi les gènes les plus fortement **induits** chez **PB260** (en vert dans le **Tableau 21**), on trouve une ‘2-isopropylmalate synthase’, une ‘aldo-keto reductase’, une ‘beta-D-xylosidase’, une ‘galactinol--sucrose galactosyltransferase’, une ‘hydroxyproline-rich glycoprotein’, deux pro-hévéines et un facteur de transcription à doigts de zinc. Parmi les gènes les plus fortement **réprimés** chez PB260 (en rouge dans le **Tableau 21**), on trouve une ‘36.4 kDa proline-rich protein’, une ‘BAHD acyltransferase DCR’, deux pectates lyases, une ‘phosphoglucomutase’, une ‘LURP-one-related 5-like’ et une synaptotagmine. Ces protéines interviennent dans le métabolisme des lipides, des sucres et dans la défense contre les pathogènes.

Concernant **RRIM600** (**Tableau 22**), seuls quatre candidats ont été identifiés : une protéine chaperonne DnaJ (réprimée), deux pro-hévéines (induites) et un facteur de transcription à doigts de zinc (induit). Les deux pro-hévéines et le facteur de transcription sont communs au clone PB260 mais leurs niveaux de surexpression en réponse à la toxine (mean TOX) sont beaucoup plus faibles. Il n'est pas étonnant de ne retrouver que quatre candidats pour RRIM600 car la technique de double hybride a été réalisée avec le clone PB260.

Ainsi, seule une partie des candidats double hybride est retrouvée dans la liste des GDEs. Cela ne veut pas dire que les autres ne sont pas impliqués dans la réponse à la cassiicoline mais juste que leur expression n'est pas impactée par la présence de la cassiicoline.

Tableau 21 – Interacteurs potentiels de la cassiicoline Cas1 identifiés par double hybride et retrouvés dans la liste des GDEs du clone PB260 traité avec la toxine purifiée Cas1

ID	Candidats double hybride	log2fc	padj	Mean CG	Mean TOX
CL1Contig14487	2-isopropylmalate synthase	3,03	2,02E-06	2 309	18 857
CL1Contig2434	36.4 kDa proline-rich protein	-4,73	9,90E-07	2 297	86
CL3105Contig2	aldo-keto reductase	2,36	6,39E-24	766	3 944
CL7194Contig1	aldose 1-epimerase-like	-1,59	7,60E-07	602	201
CL1Contig3327	B2 protein	-1,33	1,75E-14	4 935	1 959
CL1Contig14763	BAHD acyltransferase DCR	-2,27	2,61E-05	8 892	1 838
CL1Contig9522	beta-D-xylosidase	4,26	2,17E-05	1 122	21 478
CL1Contig2229	galactinol--sucrose galactosyltransferase	2,15	8,18E-07	3 239	14 358
CL1Contig16869	hydroxyproline-rich glycoprotein	2,11	6,81E-11	4 835	20 940
CL17266Contig1	molybdenum cofactor sulfurase	2,02	3,60E-06	18	73
CL1Contig13433	pectate lyase	-4,84	5,95E-06	1 254	44
CL1Contig11881	pectate lyase	-2,16	2,43E-05	9 439	2 113
CL1Contig2230	phosphoglucomutase	-2,38	1,37E-07	914	176
CL1Contig6902	pro-hevein	4,63	2,42E-18	1 267	31 343
CL1Contig496	pro-hevein	4,92	3,31E-22	175	5 326
CL1Contig11502	protein LURP-one-related 5-like	-3,32	2,54E-12	824	83
CL1660Contig3	synaptotagmin-2	-2,41	4,50E-09	1 159	219
CL7122Contig1	zinc finger protein ZAT11-like	8,13	2,14E-25	11	3 122

ID, identifiants des transcrits ; log2fc, log-ratio des valeurs d'expression des transcrits entre la condition traitée par la toxine (TOX) et la condition témoin (CG) ; padj, p-value ajustée par le FDR ; meanTOX et meanCG, moyennes de comptage.

Tableau 22 – Interacteurs potentiels de la cassiicoline Cas1 identifiés par double hybride et retrouvés dans la liste des GDEs du clone RRIM600 traité avec la toxine purifiée Cas1

ID	Candidats double hybride	log2fc	padj	Mean CG	Mean TOX
CL1079Contig4	chaperone protein dnaJ	-1,07	5,93E-04	583	278
CL1Contig6902	pro-hevein	3,65	1,94E-09	437	5 479
CL1Contig496	pro-hevein	3,72	4,08E-06	11	139
CL7122Contig1	zinc finger protein ZAT11-like	2,87	2,93E-05	195	1 424

ID, identifiants des transcrits ; log2fc, log-ratio des valeurs d'expression des transcrits entre la condition traitée par la toxine (TOX) et la condition témoin (CG) ; padj, p-value ajustée par le FDR ; meanTOX et meanCG, moyennes de comptage.

4. Discussion

4.1. La cassiicoline Cas1 jouerait un rôle dans les phases précoces de l'infection en perturbant la PTI

De nombreux arguments indiquent que la cassiicoline Cas1 est impliquée dans les phases précoces de l'infection par le champignon. Chez les clones d'hévéa sensibles, la colonisation des feuilles est rapide. En seulement 6h, en condition d'humidité élevée, le taux de germination des spores atteint 95% (Chee, 1988). Les mécanismes de pénétration sont mal connus : le champignon pourrait pénétrer par les stomates ou des blessures, ou plus vraisemblablement par des mécanismes actifs *via* la production d'enzymes hydrolytiques susceptibles de dégrader la cuticule et les parois cellulaires. En effet, un nombre particulièrement élevé de gènes codant pour des CAZymes (Carbohydrate-Associated enZymes), des lipases ou des peptidases, a été identifié dans le génome de *C. cassiicola*, comparativement à d'autres génomes fongique (Lopez *et al.*, 2018). Certaines de ces enzymes pourraient intervenir lors des étapes précoces de pénétration, et d'autres plus tardivement, pour dégrader des tissus sénescents (nécrotrophie et/ou saprotrophie). Chez les clones sensibles, les premiers symptômes de nécrose des tissus apparaissent environ 48h après inoculation par les spores du champignon. Un pic d'expression du gène *Cas1* est observé entre 24 et 48 h post-inoculation, juste avant l'apparition des premiers symptômes (Déon *et al.*, 2012a). On notera que ce pic d'expression a été observé aussi lors de l'inoculation du clone tolérant RRIM600. Le succès de l'infection dépend donc bien de facteurs de sensibilité spécifiques au clone.

Pour tenter de comprendre le mécanisme d'action de la cassiicoline Cas1 et identifier potentiellement le ou les facteur(s) de sensibilité responsable(s) de l'interaction compatible, nous avons conduit une expérimentation de "double hybride" à partir de feuilles du clone sensible PB260 inoculé par la souche CCP, en poolant quatre temps de cinétiques (12, 24, 48 et 72 hpi). Nous avons ainsi identifié une trentaine d'interacteurs protéiques potentiels de la cassiicoline Cas1. Bien que nous n'ayons pas encore confirmé, par des approches complémentaires, la réalité de l'interaction de ces candidats avec la cassiicoline, nous pouvons noter que plusieurs d'entre eux semblent impliqués dans des mécanismes défense, ce qui laisse espérer que ces interactions puissent avoir une signification biologique. Cependant, il est difficile de savoir si le rôle de la cassiicoline est de bloquer la fonction de défense de ces molécules, ou à l'inverse si ces molécules interagissent avec la cassiicoline pour l'empêcher d'atteindre une cible moléculaire vitale, ou pour la désactiver, par exemple en la dégradant ou en l'exportant hors de la cellule. Pour illustrer cette ambiguïté, le cas de quelques interacteurs potentiels de la cassiicoline est discuté ci-dessous.

Les PR protéines : Parmi les interacteurs potentiels de la cassiicoline identifiés par l'approche "double hybride", l'hévéine a été retrouvée plusieurs fois, sous deux isoformes. Les hévéines sont des lectines de la famille des PR protéines de type 4, présentant des propriétés anti-fongiques (Berthelot 2016). Elles possèdent un domaine de fixation à la chitine ce qui suggère une action directe contre les champignons, mais leur mode d'action n'est pas connu. Dans l'expérience de transcriptomique, on notera que les gènes codant les hévéines interactrices potentielles de la cassiicoline sont sur-exprimés en réponse à la cassiicoline, dans les deux clones (**Tableau 21**). La sur-expression des gènes d'hévéine en réponse à la blessure ou à un stress biotique avait été montrée auparavant (Broekaert *et al.*, 1990; Pujade-Renaud *et al.*, 2005). Cependant, dans le contexte de notre expérimentation, l'expression de ces gènes n'est pas modifiée par le grattage seul (non montré dans les résultats). Les gènes d'hévéine sont potentiellement exprimés de manière constitutive dans les feuilles, mais pourraient aussi être sur-exprimés de manière non spécifique par des éliciteurs fongiques (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns ; Ausubel, 2005) *via* des récepteurs RLK (Receptor Like kinase, Zipfel, 2014; Jones and Dangl, 2006) pour contribuer à la PTI (Pattern-Triggered Immunity). En piégeant l'hévéine, la cassiicoline l'empêcherait donc d'atteindre sa cible (potentiellement la chitine du champignon) et de remplir sa fonction anti-fongique. L'interaction serait dans ce cas défavorable à la plante. A l'inverse, la cassiicoline pourrait être l'une des cibles de l'hévéine : l'interaction hévéine-cassiicoline aurait pour effet d'inactiver la toxine et/ou de l'empêcher d'atteindre sa cible fonctionnelle ; elle serait alors favorable à la plante. Il serait intéressant de vérifier si l'interaction hévéine-cassiicoline se produit aussi chez le clone tolérant RRIM600, et avec quelle efficacité comparativement à PB260, afin de mieux comprendre l'importance de cette interaction dans le déterminisme de la sensibilité.

La 'phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein' est une autre PR protéine (de type PR-14), de la famille des 'LTP' (Lipid Transfer Proteins), identifiée parmi les interacteurs potentiels de la cassiicoline. Elle pourrait avoir une action directe contre le champignon (potentiellement en altérant sa membrane). Ce gène candidat ne fait pas partie des gènes différentiellement exprimés en réponse à cassiicoline, ce qui n'exclue pas que son expression soit modifiée en réponse aux éliciteurs fongiques. Chez le blé par exemple, une sur-expression du gène TaLTP5 codant une protéine LTP est corrélée à une augmentation de la résistance contre les champignons pathogènes *Cochliobolus sativus* et *Fusarium graminearum* (Zhu *et al.*, 2012). Dans cet exemple, il est probable que l'interaction avec la cassiicoline soit en faveur du champignon (protection contre l'action anti-fongique directe de la LTP) mais on ne peut exclure qu'elle détourne la cassiicoline d'une autre cible.

Renforcement de la paroi végétale : Comme décrit précédemment (paragraphe 2.3.3 de ce chapitre), plusieurs protéines interactrices candidates pourraient participer à l'organisation de la paroi végétale (**Tableau 15**). Or, il est connu qu'un des mécanismes de défense mis en place lors de la PTI est le renforcement des parois, afin de freiner la pénétration du pathogène (Bellincampi *et al.*, 2014; Deepak *et al.*, 2010). L'interaction de la cassiicoline Cas1 avec une ou plusieurs de ces enzymes pourrait perturber le processus de renforcement de la paroi cellulaire.

Cas du facteur de transcription de type ZAT11 : Ce facteur de transcription est sur-exprimé dans les deux clones (sensible et tolérant) en réponse à la cassiicoline (**Tableau 21**). Des modifications transcriptionnelles sont nécessaires pour la mise en place de la PTI. Il est cohérent de penser que l'interaction de la cassiicoline avec ce facteur de transcription a pour conséquence de modifier la régulation d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la cascade de signalisation conduisant à la PTI, et ce en faveur du développement du champignon. Dans cet exemple, l'action inverse (action antagoniste du facteur de transcription vis-à-vis de la cassiicoline) ne semble pas cohérente.

Autres candidats : Le rôle de la 'synaptotagmin-2' étant de réguler le trafic de protéines du cytosol vers la matrice extracellulaire (Uchiyama *et al.*, 2014), on peut émettre l'hypothèse qu'elle piège la cassiicoline pour la rejeter à l'extérieur de la cellule végétale. Quant aux candidates 'Chaperonne dnaJ A6' et 'Luminal binding protein', protéines de la famille des HSP (Heat Shock Proteins) impliquées dans le turn-over des protéines et la régulation de la mort cellulaire, leur interaction avec la cassiicoline peut avoir deux interprétations : elles pourraient piéger la cassiicoline pour la dégrader, ou à l'inverse la cassiicoline pourrait, en interagissant avec ces acteurs clés, modifier le processus de mort cellulaire programmée en faveur du champignon. Les gènes des HSPs sont en général induits très rapidement en réponse à des stress, biotiques ou abiotiques. Cependant, dans notre étude, ces gènes candidats ne semblent pas induits en réponse à la cassiicoline.

La cassiicoline pourrait donc perturber la PTI, immunité induite par la reconnaissance d'éliciteurs fongiques ou de signaux de blessure de la plante, en interagissant directement avec certaines protéines de cette voie, pour en limiter l'action. Mais ce rôle fonctionnel suffit-il à expliquer la différence de sensibilité entre les clones PB260 et RRIM600 ? Pour les candidats dont l'expression est modifiée en réponse à la cassiicoline, les profils d'expression entre le clone sensible (PB260) et le tolérant (RRIM600) semblent plutôt en contradiction avec les hypothèses formulées ci-dessus. Par exemple, les hévéines sont plus fortement exprimées chez le sensible que chez le tolérant, ce qui n'est pas en faveur d'un rôle clé de cette protéine dans le déterminisme de la sensibilité. Le facteur de transcription ZAT11 est également plus fortement sur-exprimé en réponse à la cassiicoline chez le sensible, comparativement au tolérant, ce qui peut être cohérent si

son action est en faveur de la sensibilité. Le fait que la cassiicoline modifie à la fois la régulation transcriptionnelle de ce facteur et son action (du fait de leur interaction) suggère que c'est un élément important de l'interaction héméa/*C. cassicola*.

4.2. La cassiicoline Cas1 induit la NETS chez le clone sensible

L'analyse transcriptomique de la réponse à la cassiicoline Cas1 purifiée, chez PB260 et RRIM600, a montré de manière frappante un très fort remaniement transcriptionnel chez le clone sensible PB260, avec plus de 17 000 gènes différentiellement exprimés 24h après l'application de la cassiicoline Cas1, contre 3 000 pour RRIM600. Ceci est cohérent avec le modèle NETS. En effet, il est aujourd'hui largement admis que les champignons pathogènes nécrotrophes sécrètent des toxines dont certaines peuvent être détectées de manière spécifique par des gènes R de la plante ce qui déclenche une réponse d'hypersensibilité conduisant à la mort des cellules végétales au point d'infection (**Tableau 2** de la Synthèse Bibliographique). Cette mort cellulaire est favorable au développement du champignon, compte-tenu de son mode de nutrition nécrotrophe. Seulement, l'approche transcriptomique ne nous a pas permis d'identifier clairement un gène R expliquant la sensibilité de PB260 comparativement à RRIM600, même si trois GDEs codant des récepteurs de type NBS-LRR ont été identifiés (dont un induit). Chez RRIM600, on peut supposer que ce récepteur de cassiicoline spécifique est absent ou non fonctionnel. Il n'y a donc pas de remaniement transcriptionnel massif.

Les fonctions métaboliques impactées par la cassiicoline Cas1 au niveau transcriptionnel sont très similaires à celle décrites par Winterberg *et al.* (2014), dont les travaux concernent des feuilles de blé d'un cultivar sensible infiltrées avec la protéine SnTox3 purifiée du champignon nécrotrophe *Stagonospora nodorum*. Par exemple, on observe dans les deux cas un effondrement de la machinerie photosynthétique, une induction du métabolisme des sucres, de la méthionine et de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Dans notre étude, certaines des voies métaboliques impactées sont communes aux deux clones, notamment celles impliquant le métabolisme secondaire, des chitinases (**Figure 58-A**) et des protéines de la photosynthèse (**Figure 58-B**). Par contre, la signalisation hormonale (éthylène et jasmonate notamment) pourrait expliquer les différences clonales observées. En général, les plantes utilisent une voie dépendante de l'acide salicylique pour lutter contre les agents pathogènes biotrophes et adoptent une signalisation basée sur l'acide jasmonique et l'éthylène pour lutter contre les agents pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Dans la liste complète des GDEs, ceux impliquées dans la voie de biosynthèse de l'éthylène (S-adenosylmethionine synthetase, ACC oxidase et ACC synthase), sont sur-exprimés chez PB260 mais pas chez RRIM600. Concernant l'acide jasmonique, de nombreuses études ont confirmé que la protéine JAZ (JASMONATE ZIM-DOMAIN) était un régulateur négatif de la signalisation de cette hormone. Demianski *et al.* (2012) ont montré par

exemple que *JAZ10* était l'un des gènes les plus fortement induits parmi deux *JAZs* différentiellement exprimés suite à l'interaction entre *A. thaliana* et la bactérie *Pseudomonas syringae*, augmentant ainsi la sensibilité à ce pathogène. Or, dans la liste complète des GDEs de notre étude, onze *JAZ2*, *JAZ8* et *JAZ11* sont induits par la cassiicoline chez PB260 alors qu'un gène *JAZ11* est réprimés chez RRIM600.

La cassiicoline Cas1 jouerait donc un double rôle : d'une part elle perturberait le fonctionnement de certaines protéines mises en place lors de la PTI, de manière à affaiblir/contourner cette première ligne de défense ; d'autre part, elle pourrait déclencher une réaction immunitaire exacerbée de type NETS, probablement suite à sa reconnaissance par un récepteur spécifique restant à identifier. Ce double rôle des effecteurs de nécrotrophie a été démontré dans d'autres patho-systèmes. Par exemple, le champignon nécrotrophe *Stagonospora nodorum* sécrète plusieurs effecteurs dont la toxine Tox1 qui interagit de manière spécifique avec le produit du gène R du blé *Snn1*, conduisant à la mort cellulaire et donc à la sensibilité (Liu *et al.*, 2012). Les travaux de Liu *et al.* (2016) ont mis en évidence que Tox1 jouerait un autre rôle pour le champignon lors des phases de pénétration, en le protégeant contre l'effet des chitinase. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que la toxine non seulement empêchait la chitine du champignon d'être hydrolysée par les chitinases de la plante mais également concurrençait les chitinases de l'hôte qui nécessitent une liaison pour hydrolyser la chitine plus efficacement.

Pour conclure, ce n'est probablement pas la perturbation de la PTI qui détermine le devenir de l'interaction entre les clones d'hévéa et les souches de *C. cassiicola* produisant la cassiicoline Cas1. Elle ne peut pas expliquer à elle seule les différences de sensibilité observées entre les clones PB260 et RRIM600. Il semble que ce soit la mise en place de la NETS qui favorise le développement de *C. cassiicola*, la mort des cellules hôtes (bénéfique pour le champignon) supplantant alors les mécanismes anti-fongiques de la PTI.

CONCLUSION GENERALE

PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Mes travaux de thèse s'intègrent dans un projet financé par l'IFC visant à développer des méthodes de prédiction de la sensibilité des clones d'hévéa à la maladie CLF. Mon objectif principal était d'approfondir nos connaissances sur le patho-système hévéa/*C. cassiicola* afin d'évaluer la pertinence d'une sélection (par phénotypage ou génotypage) basée indirectement sur la sensibilité à la toxine Cas1 (cassiicoline). Pour atteindre cet objectif, deux questions ont été posées, elles-mêmes déclinées en sous-parties (voir Objectifs de thèse) dont les principales conclusions sont résumées ci-dessous.

Question 1 : La sensibilité à la cassiicoline Cas1 est-elle un critère de sélection pertinent pour éliminer les clones d'hévéa les plus sensibles à la maladie CLF ?

(i) Nous avons montré que le diagnostic de la maladie CLF réalisé par observations visuelles sur les plantations d'hévéas n'est pas suffisamment fiable (Chapitre 1). Sur jeunes feuilles, les symptômes sont souvent confondus avec ceux causés par des espèces du genre *Colletotrichum*. Les deux pathogènes sont fréquemment co-isolés à partir des nécroses, ce qui pose question quant à leurs possibles interactions. Concernant le test toxinique, il est important que l'inoculum naturel fongique soit clairement identifié pour tirer des conclusions sur le caractère prédictif du test. La méthode de diagnostic moléculaire par qPCR prenant en compte la feuille dans sa globalité, mise au point lors de cette thèse, apparaît alors comme un outil plus précis nous permettant de différencier les épidémies liées à la CLF ou à l'antracnose.

(ii) Nous avons mis en évidence que la prévalence des souches porteuses du gène codant la cassiicoline Cas1 est élevée sur les plantations d'hévéas d'Afrique de l'Ouest, puisque ces souches représentent un quart de l'inoculum naturel de *C. cassiicola* (Chapitre 1) ; les souches les plus répandues étant de type A/Cas0 (plus de la moitié des souches). Nos travaux ont confirmé la spéciation géographique des gènes de cassiicoline, pour les souches associées à l'hévéa. En effet, la cassiicoline Cas1 a été retrouvée exclusivement sur le continent africain (exception faite de la souche CCP, originaire des Philippines), tandis que la forme Cas5 est prédominante en Asie. La présence du gène *Cas1* dans deux groupes génétiques distincts (A et C) est inquiétante car elle suggère la possibilité d'un transfert horizontal de ce facteur de virulence et donc le risque de sa propagation au sein des souches de groupe A, largement représentées partout dans le monde.

(iii) Nous avons démontré que la cassiicoline Cas1 détermine à elle seule la virulence de la souche CCP puisque l'inoculation d'une suspension sporale d'un mutant de délétion du gène *Cas1* ne génère aucun symptôme significatif sur des feuilles non détachées de clones d'hévéas sensibles à la souche CCP (Chapitre 2). Nos résultats montrent également que d'autres effecteurs de la

souche CCP (CAZymes et autres enzymes hydrolytiques, par exemple) pourraient intervenir dans le développement saprotrophe du champignon puisque le mutant de délétion génère des symptômes résiduels sur feuilles détachées ou blessées. Par ailleurs, un effet synergique de la blessure (par grattage de l'épiderme) et de Cas1 (*via* l'inoculation de CCP) a été observé chez les clones sensibles. Cet effet synergique peut être un avantage pour le test toxinique qui nécessite de gratter les feuilles avant d'appliquer un filtrat de culture fongique ou de la cassiicoline purifiée. En effet, on peut émettre l'hypothèse qu'en exacerbant les réponses de blessure, le test toxinique permet de mieux discriminer les clones en fonction de leur sensibilité. Par contre, ce test est plus sévère qu'un test par inoculation et ne devrait être utilisé que pour identifier et écarter les clones les plus sensibles. Une sélection basée sur la cassiicoline Cas1 sous forme purifiée est donc plus reproductible que l'utilisation de filtrats car on peut appliquer une concentration connue en toxine sur les feuilles d'hévéa.

En conclusion, la sélection basée sur la cassiicoline Cas1 est pertinente en Afrique de l'Ouest mais pas suffisante pour couvrir l'ensemble de la diversité de *C. cassiicola*. Il faut continuer à s'intéresser aux effecteurs des souches dépourvues de gène de cassiicoline afin de les intégrer également au test toxinique.

Question 2 : Quels sont les facteurs de sensibilité à la cassiicoline Cas1 chez l'hévéa ?

(iv) Nos résultats de "double hybride en levure" nous ont permis d'identifier chez le clone sensible PB260 une trentaine d'interacteurs protéiques potentiels interagissant physiquement avec la cassiicoline Cas1 (Chapitre 3). Certains de ces candidats pourraient intervenir dans la mise en place de la PTI et il est possible que la cassiicoline perturbe ce premier niveau d'immunité dans le but de coloniser la plante.

(v) L'approche transcriptomique nous a permis d'identifier les principales voies fonctionnelles impactées par la cassiicoline en comparant le clone sensible PB260 et le clone tolérant RRIM600 (Chapitre 3). Un très fort remaniement transcriptionnel a été observé chez le clone sensible, en accord avec l'hypothèse de la sensibilité induite par les effecteurs nécrotrophes (NETS), ce qui implique une reconnaissance spécifique de la cassiicoline par un récepteur de la plante. Malgré un fort degré de chevauchement dans les réponses de défense de ces deux clones, il existe des différences pouvant influencer le résultat de l'interaction (voie hormonale notamment).

Ainsi, le rôle de la cassiicoline Cas1 est double : elle perturbe la PTI et induit la NETS. En l'état actuel des choses, ces deux approches ne permettent pas d'identifier précisément le récepteur de la cassiicoline. Des études complémentaires sont nécessaires. Une fois identifié, un test de génotypage basé sur le polymorphisme des facteurs de sensibilité à la cassiicoline (cibles fonctionnelles ou récepteur) pourrait être complémentaire du test toxinique.

PERSPECTIVES

Poursuite de l'étude de l'inoculum fongique en Afrique de l'Ouest

L'étude de l'inoculum naturel fongique est une démarche nécessaire qui nous a permis d'identifier les agents pathogènes foliaires pré-dominants sur les plantations d'hévéas en Afrique de l'Ouest. La méthode de diagnostic moléculaire par qPCR des maladies CLF et anthracnose mise au point durant cette thèse, pourrait être un outil moléculaire utile pour réaliser une étude épidémiologique à grande échelle afin de suivre la dynamique des champignons *Colletotrichum spp* et *C. cassiicola* en fonction de la phénologie, des périodes épidémiques, du macro- et du micro-climat, de la localisation géographique, etc. Cependant, quelques améliorations peuvent être apportées. Tout d'abord, le fait de travailler sur de l'ADNg ne permet pas de distinguer les champignons vivants de ceux qui sont morts. Sur des feuilles d'hévéas prélevées en fin d'année, il y a un risque de quantifier de l'ADNg fongique provenant d'individus détruits par le système immunitaire de la plante. Pour pallier à ce problème, il pourrait être intéressant de travailler à partir des ARNs totaux de la feuille et des champignons en choisissant des amorces ciblant un gène constitutif. Par ailleurs, cette approche par qPCR pourrait être adaptée pour décrire la typologie des souches de *C. cassiicola*. Il faudrait pour cela dessiner des amorces spécifiques de chaque groupe génétique et chaque gène de cassiicoline. La séquence des 37 génomes de *C. cassiicola*, représentatifs de différents types (Lopez *et al.*, 2018), nous permettra d'identifier des gènes cibles pertinents pour cette étude. Néanmoins, il est impossible d'appliquer cette méthode sur les plantations à cause du coût de la qPCR et du manque d'équipement approprié. La technique LAMP (Loop-mediated isothermal AMplification) représente une technologie alternative à la PCR, ne nécessitant ni d'appareil lourd et sophistiqué, ni personnel qualifié (Notomi *et al.*, 2000). Elle permet d'amplifier en moins d'une heure l'ADN cible à température constante (60-65°C) à l'aide d'amorces spécifiques et d'une polymérase. La détection des produits d'amplification se fait à l'œil nu à l'aide d'une réaction colorée du milieu réactionnel. Cette technique a déjà fait ses preuves lors de la détection de plusieurs champignons pathogènes du soja tels que *Fusarium equiseti* (Lu *et al.*, 2015), *F. asiaticum* (Xu *et al.*, 2017), *Colletotrichum truncatum* (Tian *et al.*, 2017) et *C. gloeosporioides* (Wang *et al.*, 2017). Seulement, elle n'est pas quantitative et ne pourrait être utilisé que pour vérifier la présence de *Colletotrichum* ou de *Corynespora*, en particulier lors d'échanges de matériel végétal entre pays.

Validation du mode d'action de la cassiicoline Cas1

Des hypothèses ont été émises sur le rôle que joue Cas1 dans les mécanismes de sensibilité/tolérance des clones d'hévéa. Seulement, certaines validations indispensables doivent être effectuées concernant les techniques utilisées dans le Chapitre 3. Tout d'abord, il est nécessaire de s'assurer que les candidats identifiés par double hybride soient de vrais interacteurs de la cassiicoline Cas1, sachant que cette technique génère beaucoup de faux positifs. Il nous faut donc confirmer nos résultats par une autre technique d'interaction protéine-protéine telle que le BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation). Il s'agit d'une technique *in planta* où les deux protéines d'intérêt seront chacune couplées à une moitié de la protéine fluorescente YFP (Yellow Fluorescent Protein). La capacité des deux protéines à interagir physiquement permet la reconstitution d'une protéine YFP fonctionnelle, entraînant l'apparition d'une fluorescence dans la cellule végétale. L'avantage de cette technique est qu'elle permet non seulement de détecter des interactions *in vivo*, dans un système modèle végétal (le tabac), mais aussi de déterminer le compartiment subcellulaire dans laquelle l'interaction a lieu. Le BiFC permettrait de valider de manière définitive certains des candidats interacteurs identifiés par le double hybride.

Une autre stratégie adoptée est de positionner les gènes candidats sur les cartes génétiques de l'hévéa pour voir s'ils co-localisent avec les QTL de sensibilité à la cassiicoline identifiés lors de la thèse de Tran Dinh Minh (2013-2016). Cela sera réalisé par génotypage SNP des gènes candidats à l'aide de la méthode KASPar (KBioscience). Les marqueurs SNP des candidats les plus pertinents (confirmés par BiFC ou co-localisés avec les QTL de sensibilité à Cas1) pourront ensuite être testés pour leur capacité à prédire la sensibilité des clones testés, en croisant les données de génotypage et de phénotypage. Si aucun des SNP associés aux candidats ne peut être relié au phénotype de sensibilité/tolérance, il peut être envisagé d'affiner les QTL de sensibilité à Cas1 pour se rapprocher du gène de sensibilité, voire pour l'identifier. Pour cela, d'autres marqueurs SNP peuvent être recherchés dans ces QTL en comparant les génomes d'hévéa séquencés, qui seront disponibles *via* le 'Hevea Genome Hub' en cours de développement dans le cadre d'un partenariat international.

Concernant l'approche transcriptomique, plusieurs points restent à améliorer. Les travaux futurs visent à actualiser l'annotation du transcriptome synthétique PB260+RRIM600 et à refaire une analyse d'enrichissement ontologique (GO). En effet, de nombreuses protéines ne sont pas annotées ou apparaissent comme étant des 'hypothetical protein' ou des 'uncharacterized protein'. Cela ne changerait sûrement pas les principales fonctions biologiques impactées par la toxine mais nous verrions peut-être apparaître d'autres candidats intéressants. De plus, une recherche par gène candidat pourrait permettre de ne se focaliser que sur une fonction en particulier (comme dans le cas des récepteurs RLK et NBS-LRR) et de mettre en avant des différences plus précises entre les deux clones. Une validation des candidats les plus pertinents par qPCR serait nécessaire

Importance des souches Cas0

Les souches de *C. cassicola* dépourvues de gène codant la cassiicoline (Cas0) représentent deux tiers de l'inoculum naturel présent sur les feuilles d'hévéa en Afrique de l'Ouest. Il a été montré que la toxicité des filtrats de culture de certaines de ces souches (notamment les souches A/Cas0) est égale ou supérieure à celle de souches C/Cas1 réputées très agressives, et à la toxine purifiée à 5 et 10 µg/ml (Tran *et al.*, 2016, Chapitre 2 de cette thèse) ; ce qui suggère l'implication d'effecteurs autres que la cassiicoline. D'ailleurs, d'autres QTL que ceux révélés par Cas1 ont été identifiés au moyen du test toxinique en utilisant des filtrats de souches Cas0 (Tran *et al.*, 2016, Chapitre 2 de cette thèse). Il semble donc important de s'intéresser aussi aux effecteurs de ces souches Cas0.

Une tentative de purification biochimique des effecteurs de deux souches A/Cas0 avait été initiée mais sans succès. Chez les pathogènes du blé, peu d'effecteurs ont été purifiés par des approches biochimiques. L'approche privilégiée actuellement est plutôt d'identifier les gènes d'effecteurs potentiel par séquençage de génomes, de les cloner puis de les exprimer en système hétérologue (levures). Il est possible également de faire synthétiser les effecteurs candidats, s'ils sont de petite taille. Chez le blé, le filtrat de culture des levures contenant l'effecteur fongique est testé par infiltration de feuilles détachées, à l'aide d'une seringue sans aiguille. L'observation des symptômes est en général visuelle et qualitative : présence/absence, type de symptôme (chlorose et/ou nécrose). Chez l'hévéa, l'infiltration des feuilles à la seringue n'est pas possible, mais le filtrat de culture des levures peut être testé au moyen du test toxinique.

Les travaux de génomique comparative de 35 souches de *C. cassicola* (dont 18 souches Cas0) séquencées dans le cadre du projet IFC (Lopez *et al.*, 2018), ont mis en évidence l'implication d'un large panel d'effecteurs putatifs. Pour identifier parmi tous ces candidats les effecteurs fonctionnels des souches Cas0 qui pourraient être impliqués dans la virulence chez l'hévéa, une étude transcriptomique pourrait être conduite sur le modèle de celle réalisée avec la souche CCP (Lopez *et al.*, 2018) : une souche Cas0 virulente sera inoculée sur un clone sensible et le transcriptome fongique analysé par RNA-Seq pour identifier les effecteurs différentiellement exprimés lors des phases précoces de l'interaction compatible. Pour valider ces candidats en tant qu'effecteurs de virulence, une stratégie peut être de réaliser des mutants perte ou gain de fonction par transformation génétique de *C. cassicola* et de comparer la virulence des souches mutées avec celle de la souche Cas0 d'origine, sur un panel de clones d'hévéa de sensibilité variable (comme décrit dans la Chapitre 2). Ou alors, les effecteurs candidats peuvent être synthétisés en levures, et testés sous forme de filtrats de culture de levures au moyen du test toxinique.

L'ensemble de ces travaux de thèse ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes régissant l'interaction hévéa/*C. cassiicola* et de proposer des outils et méthodes pour améliorer le diagnostic de la maladie et l'identification des clones les plus sensibles. Nous avons montré que la sélection basée sur la sensibilité à la cassiicoline Cas1 est une voie prometteuse pour identifier les clones très sensibles aux souches de *Corynespora* de type Cas1, très représentées et considérées comme les plus virulentes sur les plantations d'Afrique de l'Ouest. Dans le cadre d'un programme de sélection conduit en partenariat avec l'IFC, il a été décidé de développer dès maintenant le test toxinique pour évaluer la sensibilité d'une centaine de nouveaux clones, pré-sélectionnés sur des critères de croissance et de paramètres physiologiques du latex. Ils seront évalués en priorité pour leur sensibilité à la cassiicoline Cas1 purifiée et à quelques filtrats de souches Cas0. Les résultats seront confirmés par des inoculations en conditions contrôlées réalisées en France, avec quelques souches représentatives de l'espèce *C. cassiicola*. Les nouveaux clones seront aussi évalués en "champs de clones à petite échelle" (CCPE) dans une parcelle entourée d'arbres malades (clone IRCA18, très sensible à *Corynespora*). L'outil de diagnostic par qPCR (amélioré pour pouvoir décrire la typologie des souches *C. cassiicola*) sera utilisé pour caractériser plus précisément l'inoculum naturel, en lien avec les symptômes observés.

Ultérieurement, le test toxinique pourra être amélioré en utilisant des effecteurs spécifiques pertinents produits en levure, en particulier la cassiicoline des souches asiatiques de type B/Cas5, ou encore des effecteurs de souches A/Cas0. A plus long terme, lorsque les facteurs pertinents de la sensibilité à Cas1 auront été identifiés, un test de génotypage pourra être proposé, complémentaire des tests de phénotypage, pour identifier à grande échelle et haut débit les clones sensibles à Cas1.

REFERENCES

- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A.M.** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.*, **17**, 73–90.
- Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. and Kohmoto, K.** (1997) AAL-Toxin-Deficient Mutants of *Alternaria alternata* Tomato Pathotype by Restriction Enzyme-Mediated Integration. *Phytopathology*, **87**, 967–972.
- Ali, S. and Francl, L.J.** (2002) Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates obtained from wheat in South America. *Plant Prot. Sci.*, **38**, 302–304.
- Andrews, E.H. and Dickenson, P.B.** (1961) Preliminary electron microscope observations on the ultra-structure of the latex vessel and its contents in young tissue of *Hevea brasiliensis*. *Prelim. electron Microsc. Obs. ultra-structure latex Vessel its contents young tissue Hevea Bras.*
- Andrews, S.** (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at : <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Archer, B.L. and Audley, B.G.** (1987) New aspects of rubber biosynthesis. *Bot. J. Linn. Soc.*, **94**, 181–196.
- Atan, S. and Hamid, N.H.** (2003) Differentiating Races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and Internal Transcribed Spacer Markers. *J. Rubber Res.*, **6**, 58.
- Ausubel, F.M.** (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.*, **6**, 973–979.
- Bari, R. and Jones, J.D.G.** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 473–488.
- Barthe, P., Pujade-Renaud, V., Breton, F., Gargani, D., Thai, R., Roumestand, C. and Lamotte, F. de** (2007) Structural Analysis of Cassiicolin, a Host-selective Protein Toxin from *Corynespora cassiicola*. *J. Mol. Biol.*, **367**, 89–101.
- Bednarek, P.** (2012) Chemical warfare or modulators of defence responses – the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **15**, 407–414.
- Bellincampi, D., Cervone, F. and Lionetti, V.** (2014) Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Front. Plant Sci.*, **5**, 228.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y.** (1995) Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.*, **57**, 289–300.
- Benjamini, Y. and Yekutieli, D.** (2001) *The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency.*
- Berthelot, K., Peruch, F. and Lecomte, S.** (2016) Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins. *Biochimie*, **127**, 258–270.
- Bigeard, J., Colcombet, J. and Hirt, H.** (2015) Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant*, **8**, 521–539.
- Biswal, B., N. K., C., Sahu, P. and U. C., B.** (1983) Senescence of Detached Fern Leaves. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1203–1208.
- Bowles, D.J.** (1990) Defense-Related Proteins in Higher Plants. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 873–907.
- Breton, F., Garcia, D., Sanier, C., Eschbach, J.M. and D’Auzac, J.** (1997) L’interaction entre *Corynespora cassiicola* et *Hevea brasiliensis*. *Plant. Rech. Dev.*, **4**.
- Breton, F., Sanier, C. and D’Auzac, J.** (2000) Role of cassiicolin, a host-selective toxin in

- pathogenicity of *C. cassiicola*, causal agent of leaf disease of Hevea. *J. Nat. Rubber Res.*, **3**, 115–128.
- Breton, F., Sanier, C. and D’Auzac, J.** (1997) Scopoletin production and degradation in relation to resistance of Hevea brasiliensis to *Corynespora cassiicola*. *J. Plant Physiol.*, **151**, 595–602.
- Broekaert, I., Lee, H.I., Kush, A., Chua, N.H. and Raikhel, N.** (1990) Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (Hevea brasiliensis). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 7633–7.
- Brown, A.E. and Soepena, H.** (1994) Pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves of Hevea spp. *Mycol. Res.*, **98**, 264–266.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F. and Lorenzo, G. De** (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 9452–7.
- Cai, L., Ji, K.-F. and Hyde, K.D.** (2006) Variation between freshwater and terrestrial fungal communities on decaying bamboo culms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **89**, 293–301.
- Camera, S. La, Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M. and Heitz, T.** (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.*, **198**, 267–284.
- Carris, L.M., Glawe, D.A. and Gray, L.E.** (1986) Isolation of the Soybean Pathogens *Corynespora cassiicola* and *Phialophora gregata* from Cysts of Heterodera glycines in Illinois. *Mycologia*, **78**, 503.
- Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. and Vaillancourt, L.** (2001) Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, **91**, 558–564.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J.** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Report.*, **11**, 113–116.
- Chanruang, N.** (2000) Status of *Corynespora* leaf fall in Thailand. In *IRRDB Workshop on Corynespora Leaf Fall of Rubber, 6-14 June, (Kuala Lumpur, Malaysia and Medan, Indonesia)*.
- Chee, K.H.** (1990) Present status of rubber diseases and their control. *Rev. Plant Pathol.*, **69**, 423–430.
- Chee, K.H.** (1988) Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on Hevea rubber. *J. Nat. Rubber Res.*, **3**, 21–29.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and Fields, S.** (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 9578–82.
- Chow, K.-S., Mat-Isa, M.-N., Bahari, A., Ghazali, A.-K., Alias, H., Mohd.-Zainuddin, Z., Hoh, C.-C. and Wan, K.-L.** (2012) Metabolic routes affecting rubber biosynthesis in Hevea brasiliensis latex. *J. Exp. Bot.*, **63**, 1863–1871.
- Ciuffetti, L.M., Manning, V.A., Pandelova, I., et al.** (2014) *Pyrenophora tritici-repentis*: A plant pathogenic fungus with global impact. In *Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens*. pp. 1–39.
- Ciuffetti, L.M., Manning, V.A., Pandelova, I., Betts, M.F. and Martinez, J.P.** (2010) Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *New Phytol.*, **187**, 911–919.

- Collado, J., Platas, G., Gonzalez, I. and Pelaez, F.** (1999) Geographical and Seasonal Influences on the Distribution of Fungal Endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.*, **144**, 525–532.
- Compagnon, P.** (1986) *Le caoutchouc naturel : biologie, culture, production*. Maisonneuv..
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J.E.** (2015) Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 487–511.
- D’Auzac, J., Créatin, H., Marin, B. and Lioret, C.** (1982) A plant vacuolar system: the lutoids from *Hevea brasiliensis* latex. *Physiol. Vég.*, **20**, 311–331.
- D’Auzac, J., Jacob, J.L., Prévôt, J.C., Clément, A., Gallois, R., Crestin, H., Lacote, R. and Pujade-Renaud, V.** (1997) The regulation of cis-polyisoprene production (natural rubber) from *Hevea brasiliensis*. *Recent Res. Devel. Plant Physiol.*, 272–332.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826–833.
- Dean, R., Kan, J. Van, Pretorius, Z.A., et al.** (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 414–430.
- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R.K., Muck, A., Mithöfer, A. and Shetty, S.H.** (2010) Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence. *J. Phytopathol.*, **158**, 585–593.
- Deighton, F.C.** (1936) Preliminary List of Fungi and Diseases of Plants in Sierra Leone. *Bull. Misc. Inf. (Royal Gard. Kew)*, **1936**, 397.
- Deising, H.B., Werner, S. and Wernitz, M.** (2000) The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect.*, **2**, 1631–1641.
- Demianski, A.J., Chung, K.M. and Kunkel, B.N.** (2012) Analysis of Arabidopsis JAZ gene expression during *Pseudomonas syringae* pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 46–57.
- Déon, M.** (2012) *Importance de la cassiicoline en tant qu’effecteur de la Corynespora Leaf Fall (CLF) chez l’hévéa.*
- Déon, M., Bourré, Y., Gimenez, S., et al.** (2012) Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Sci.*, **185–186**, 227–37.
- Déon, M., Fumanal, B., Gimenez, S., et al.** (2014) Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biol.*, **118**, 32–47.
- Déon, M., Scomparin, A., Tixier, A., Mattos, C.R.R., Leroy, T., Seguin, M., Roedel-Drevet, P. and Pujade-Renaud, V.** (2012) First characterization of endophytic *Corynespora cassicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Divers.*, **54**, 87–99.
- Dixon, L.J., Schlub, R.L., Pernezny, K. and Datnoff, L.E.** (2009) Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassicola*. *Phytopathology*, **99**, 1015–1027.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., et al.** (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, **478**, 395–398.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B. and Ellis, J.G.** (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 8888–93.
- Doolittle, W.F.** (1999) Lateral genomics. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, M5–M8.

- Duan, X., Zhang, Z., Wang, J. and Zuo, K.** (2016) Characterization of a Novel Cotton Subtilase Gene GbSBT1 in Response to Extracellular Stimulations and Its Role in Verticillium Resistance X. Zhang, ed. *PLoS One*, **11**, e0153988.
- Duke, S.O. and Dayan, F.E.** (2011) Modes of Action of Microbially-Produced Phytotoxins. *Toxins (Basel)*, **3**, 1038–1064.
- Dung, P.T. and Hoan, N.T.** (2000) Corynespora leaf fall on rubber in Vietnam, a new record. *Proceeding IRRDB Symp.*, 273–275.
- Falcone, D.L., Gibson, S., Lemieux, B. and Somerville, C.** (1994) Identification of a gene that complements an Arabidopsis mutant deficient in chloroplast omega 6 desaturase activity. *Plant Physiol.*, **106**, 1453–9.
- Farr, D.F. and Rossman, A.Y.** (2016) Fungal Databases. *Syst. Mycol. Microbiol. Lab. ARS, USDA*.
- Fields, S. and Song, O.** (1989) A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, **340**, 245–246.
- Figueiredo, A., Monteiro, F. and Sebastiana, M.** (2014) Subtilisin-like proteases in plant-pathogen recognition and immune priming: a perspective. *Front. Plant Sci.*, **5**, 739.
- Figueiredo, J., Sousa Silva, M. and Figueiredo, A.** (2018) Subtilisin-like proteases in plant defence: the past, the present and beyond. *Mol. Plant Pathol.*, **19**, 1017–1028.
- Finkina, E.I., Melnikova, D.N., Bogdanov, I. V and Ovchinnikova, T. V** (2016) Lipid Transfer Proteins As Components of the Plant Innate Immune System: Structure, Functions, and Applications. *Acta Naturae*, **8**, 47–61.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L. and Gurr, S.J.** (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, **484**, 186–194.
- Flor, H.H.** (1955) Host-parasite interaction in flax rust: its genetics and other implications. *Phytopathology*, **45**, 680–685.
- Frey-Wyssling, A.** (1932) Studies on the dilution reaction and the movement of the latex of Hevea brasiliensis during tapping. *Arch Rubbercult*, **16**, 285–327.
- Friesen, Timothy L., Faris, J.D., Solomon, P.S. and Oliver, R.P.** (2008) Host-specific toxins: Effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell. Microbiol.*, **10**, 1421–1428.
- Friesen, T.L., Stukenbrock, E.H., Liu, Z., et al.** (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat. Genet.*, **38**, 953–6.
- Friesen, Timothy L, Zhang, Z., Solomon, P.S., Oliver, R.P. and Faris, J.D.** (2008) Characterization of the interaction of a novel Stagonospora nodorum host-selective toxin with a wheat susceptibility gene. *Plant Physiol.*, **146**, 682–93.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. and Li, W.** (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, **28**, 3150–3152.
- Gao, F.-K., Dai, C.-C. and Liu, X.-Z.** (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African J. Microbiol. Res.*, **4**, 1346–1351.
- Garcia, D., Sanier, C., Macheix, J.J. and D’Auzac, J.** (1995) Accumulation of scopoletin in Hevea brasiliensis infected by Microcyclus ulei (P. Henn.) V. ARX and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **47**, 213–223.
- Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F.J., Boonham, N., Colyer, A., Cantoral, J.M. and**

- Budge, G.** (2009) Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathol.*, **58**, 43–51.
- Gazis, R. and Chaverri, P.** (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecol.*, **3**, 240–254.
- George, M.K. and Edathil, T.T.** (1980) A report on *Corynespora* leaf spot disease on mature rubber. In *International Rubber Conference*.
- Giesemann, A., Biehl, B. and Lieberei, R.** (1986) Identification of Scopoletin as a Phytoalexin of the Rubber Tree *Hevea brasiliensis*. *J. Phytopathol.*, **117**, 373–376.
- Gilchrist, D.G., Bostock, R.M. and Wang, H.** (1995) Sphingosine-related mycotoxins in plant and animal diseases. *Can. J. Bot.*, **73**, 459–467.
- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 205–227.
- Gomez, J.B. and Moir, G.F.J.** (1979) The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. *Malaysian Rubber Res. Dev. Board Monogr. (Malaysia)*. no. 4.
- Gond, S.K., Verma, V.C., Kumar, A., Kumar, V. and Kharwar, R.N.** (2007) Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Corraeae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1371–1375.
- Guillemette, T., Ram, A.F.J., Carvalho, N.D.S.P., Joubert, A., Simoneau, P. and Archer, D.B.** (2011) Methods for Investigating the UPR in Filamentous Fungi. In *Methods in enzymology*. pp. 1–29.
- Gupta, D. and Tuteja, N.** (2011) Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signal. Behav.*, **6**, 232–236.
- Guyot, J., Omanda, E.N., Ndoutoume, A., Otsaghe, A.-A.M., Enjalric, F. and Assoumou, H.-G.N.** (2001) Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production. *Crop Prot.*, **20**, 581–590.
- Hack, E., Lin, C., Yang, H. and Horner, H.T.** (1991) T-URF 13 Protein from Mitochondria of Texas Male-Sterile Maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.*, **95**, 861–70.
- Hallé, F. and Martin, R.** (1968) Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) (Müll. Arg., Euphorbiacées, crotonoïdées). *Adansonia*, **8**, 475–503.
- Hashem, A., Fathi, E., Allah, A. and Alqarawi, A.A.** (2018) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Stress Tolerance. In Springer, Singapore, pp. 81–103.
- Hattenbach, A. and Heineke, D.** (1999) On the role of chloroplastic phosphoglucomutase in the regulation of starch turnover. *Planta*, **207**, 527–532.
- Heath, M.C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**, 315–319.
- Héban, C.** (1981) Ontogénie des laticifères du système primaire de l' *Hevea brasiliensis* : une étude ultrastructurale et cytochimique. *Can. J. Bot.*, **59**, 974–985.
- Heese-Peck, A. and Raikhel, N. V.** (1998) A Glycoprotein Modified with Terminal N-Acetylglucosamine and Localized at the Nuclear Rim Shows Sequence Similarity to Aldose-1-Epimerases.,
- Heil, M. and Land, W.G.** (2014) Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life. *Front. Plant Sci.*, **5**, 578.

- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. and Doehlemann, G.** (2012) The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity J.-R. Xu, ed. *PLoS Pathog.*, **8**, e1002684.
- Hieu, N.D., Nghia, N.A., Chi, V.T.Q. and Dung, P.** (2014) Genetic diversity and pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber trees and other hosts in Vietnam. *J Rubber Res.*, **17**, 187–203.
- Hoorn, R.A.L. van der and Kamoun, S.** (2008) From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, **20**, 2009–17.
- Howard, R.J.** (1997) Breaching the Outer Barriers — Cuticle and Cell Wall Penetration. In *Plant Relationships*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 43–60.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H. and Money, N.P.** (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 11281–4.
- Huang, H.K., Liu, C.E., Liou, J.H., Hsiue, H.C., Hsiao, C.H. and Hsueh, P.R.** (2010) Subcutaneous infection caused by *Corynespora cassiicola*, a plant pathogen. *J. Infect.*, **60**, 188–190.
- Husson, F., Josse, J., Le, S. and Mazet, J.** (2016) FactoMineR: multivariate exploratory data analysis and data mining. *Agrocampus-ouest, Fr.*
- Hyde, K.D. and Soyong, K.** (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers.*, **33**, 73.
- Hyde, K D, Bussaban, B., Photita, A.W., et al.** (2007) Diversity of saprobic microfungi. *Biodivers Conserv*, **16**, 7–35.
- Jalgaonwala, R.E., Mohite, B.V. and Mahajan, R.T.** (2011) A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol. Res. Sch. Res. Libr. J. Microbiol. Biotech. Res.*, **1**, 21–32.
- Javier Fernández-Acero, F., Carbú, M., Garrido, C., Vallejo, I. and Cantoral, J.M.** (2007) Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. *Curr. Proteomics*, **4**, 79–88.
- Jayasinghe, C.K.** (2003) *Corynespora* leaf fall and future of the leading rubber clones in the world. *Bull. Rubber Res. Inst. Sri Lanka*, **44**, 5–11.
- Jayasinghe, C.K.** (1997) Leaf fall disease a threat to world NR industry. *Rubber Asia*, **11**, 55–56.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B.** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.*, **19**, 4004–14.
- Jinji, P., Xin, Z., Yangxian, Q., Yixian, X., Huiqiang, Z. and He, Z.** (2007) First record of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber tree in China. *Australas. Plant Dis. Notes*, **2**, 35.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.
- Jonge, R. de, Esse, H.P. van, Kombrink, A., et al.** (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, **329**, 953–5.
- Jonge, R. de, Esse, H.P. van, Maruthachalam, K., et al.** (2012) Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 5110–5.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N.** (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 11086–91.

- Kanneganti, T.-D., Huitema, E. and Kamoun, S.** (2007) In planta Expression of Oomycete and Fungal Genes. In *Plant-Pathogen Interactions*. New Jersey: Humana Press, pp. 35–44.
- Kapila, J., Rycke, R. De, Montagu, M. Van and Angenon, G.** (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.*, **122**, 101–108.
- Kar, M., Streb, P., Hertwig, B. and Feierabend, J.** (1993) Sensitivity to photodamage increases during senescence in excised leaves. *J. Plant Physiol.*, **141**, 538–544.
- Kema, G.H., Yu, D., Rijkenberg, F.H., Shaw, M.W. and Baayen, R.P.** (1996) History of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology*, **86**, 777–789.
- Knoth, C. and Eulgem, T.** (2008) The oomycete response gene LURP1 is required for defense against *Hyaloperonospora parasitica* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **55**, 53–64.
- Koenning, S.R., Creswell, T.C., Dunphy, E.J., Sikora, E.J. and Mueller, J.D.** (2006) Increased Occurrence of Target Spot of Soybean Caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. *Plant Dis.*, **90**, 974–974.
- Kohmoto, K., Kondoh, Y., Kohguchi, T., Otani, H., Nishimura, S. and Scheffer, R.P.** (1984) Ultrastructural changes in host leaf cells caused by host-selective toxin of *Alternaria alternata* from rough lemon. *Can. J. Bot.*, **62**, 2485–2492.
- Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C.S. and Flaishman, M.A.** (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 4080–7.
- Konno, K.** (2011) Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, **72**, 1510–1530.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., et al.** (2010) Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J. Biol. Chem.*, **285**, 13471–9.
- Lakshmanan, P., Jeyarajan, R. and Vidhyasekaran, P.** (1990) A boll rot of cotton caused by *Corynespora Cassiicola* in Tamil Nadu, India. *Phytoparasitica*, **18**, 171–173.
- Laluk, K. and Mengiste, T.** (2010) Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *Arab. B.*, **8**, e0136.
- Lamari, L., Gilbert, J. and Tekauz, A.** (1998) Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.*, **20**, 396–400.
- Lamotte, F. de, Duviau, M.P., Sanier, C., Thai, R., Poncet, J., Bieysse, D., Breton, F. and 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 Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **849**, 357–362.
- Lê, S., Josse, J., Rennes, A. and Husson, F.** (2008) *FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis*.
- Lee, S., Mel 'nik, V., Taylor, J.E. and Crous, P.W.** (2004) Diversity of saprobic hyphomycetes on Proteaceae and Restionaceae from South Africa. *Fungal Divers.*, **17**, 91–114.
- Li, H. and Durbin, R.** (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754–1760.
- Lieberei, R.** (2007) South American leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. *Ann. Bot.*, **100**, 1125–42.
- Liu, J.-Z. and Whitham, S.A.** (2013) Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ

- domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance. *Plant J.*, **74**, 110–121.
- Liu, X., Cao, S., Zhang, H., Wei, Y. and Pu, J.** (2017) CCK1, a PMK1-type MAP kinase is required for hyphal growth, pigmentation, conidiation, enzyme activity, osmotic stress response, and pathogenicity in *Corynespora cassiicola*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1–11.
- Liu, X., Li, B., Cai, J., Zheng, X., Feng, Y. and Huang, G.** (2018) *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Rubber Trees in China. *Sci. Rep.*, **8**, 10435.
- Liu, Z., Faris, J.D., Oliver, R.P., et al.** (2009) SnTox3 Acts in Effector Triggered Susceptibility to Induce Disease on Wheat Carrying the Snn3 Gene A. Andrianopoulos, ed. *PLoS Pathog.*, **5**, e1000581.
- Liu, Z., Gao, Y., Kim, Y.M., Faris, J.D., Shelver, W.L., Wit, P.J.G.M. de, Xu, S.S. and Friesen, T.L.** (2016) SnTox1, a *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector, is a dual-function protein that facilitates infection while protecting from wheat-produced chitinases. *New Phytol.*, **211**, 1052–1064.
- Liu, Z., Holmes, D.J., Faris, J.D., Chao, S., Brueggeman, R.S., Edwards, M.C. and Friesen, T.L.** (2015) Necrotrophic effector-triggered susceptibility (NETS) underlies the barley – *Pyrenophora teres f. teres* interaction specific to chromosome 6H. *Mol. Plant Pathol.*, **16**, 188–200.
- Liu, Z., Zhang, Z., Faris, J.D., et al.** (2012) The Cysteine Rich Necrotrophic Effector SnTox1 Produced by *Stagonospora nodorum* Triggers Susceptibility of Wheat Lines Harboring Snn1 B. Tyler, ed. *PLoS Pathog.*, **8**, e1002467.
- Liyanage, A., Jayasinghe, C., Liyanage, N. and Jayaratne, A.** (1986) *Corynespora* leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*) — a new record. *Rubb. Res. Inst. Sri Lanka*, **65**, 47–50.
- Liyanage, A.D.S., Jayasinghe, C.K. and Liyanage, N.I.S.** (1989) Losses due to *Corynespora* leaf fall disease and its eradication. *Proc. Rubber Res. Inst. Malaysia-Rubber Grow. Conf. Malacca, Malaysia*, 401–410.
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., Jordá, L., Parker, J. and Molina, A.** (2008) Repression of the Auxin Response Pathway Increases Arabidopsis Susceptibility to Necrotrophic Fungi. *Mol. Plant*, **1**, 496–509.
- Loon, L.C. Van, Rep, M. and Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants.
- Lopez, D., Bronner, G., Brunel, N., et al.** (2012) Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *J. Exp. Bot.*, **63**, 2217–2230.
- Lopez, D., Ribeiro, S., Label, P., et al.** (2018) Genome-Wide Analysis of *Corynespora cassiicola* Leaf Fall Disease Putative Effectors. *Front. Microbiol.*, **9**, 276.
- Lorang, J., Kidarsa, T., Bradford, C.S., Gilbert, B., Curtis, M., Tzeng, S.-C., Maier, C.S. and Wolpert, T.J.** (2012) Tricking the guard: exploiting plant defense for disease susceptibility. *Science*, **338**, 659–62.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., et al.** (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol. Rev.*, **220**, 60–81.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S.** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, **15**, 550.
- Lu, B., Xu, C., Awai, K., Jones, A.D. and Benning, C.** (2007) A small ATPase protein of

- Arabidopsis, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J. Biol. Chem.*, **282**, 35945–53.
- Lu, C., Zhang, H., Wang, Y. and Zheng, X.** (2015) Rapid diagnosis of Fusarium root rot in soybean caused by Fusarium equiseti or Fusarium graminearum using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays. *Australas. Plant Pathol.*, **44**, 437–443.
- Lu, S., Faris, J.D., Sherwood, R., Friesen, T.L. and Edwards, M.C.** (2014) A dimeric PR-1-type pathogenesis-related protein interacts with ToxA and potentially mediates ToxA-induced necrosis in sensitive wheat. *Mol. Plant Pathol.*, **15**, 650–663.
- Lu, Y., Li, Y., Zhang, J., Xiao, Y., Yue, Y., Duan, L., Zhang, M. and Li, Z.** (2013) Overexpression of Arabidopsis Molybdenum Cofactor Sulfurase Gene Confers Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.) L.-S. P. Tran, ed. *PLoS One*, **8**, e52126.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. and Ton, J.** (2011) Callose Deposition : A Multifaceted Plant Defense Response. , **24**, 183–193.
- Ma, L.-J., Does, H.C. van der, Borkovich, K.A., et al.** (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. *Nature*, **464**, 367–373.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Dangl, J.L.** (2003) Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell*, **112**, 379–389.
- Mahgoub, E.** (1969) *Corynespora cassiicola*, a new agent of maduromycetoma. *J. Trop. Med. Hyg.*, **72**, 218–21.
- Manju, M., Idicula, S.P., Kuruvilla Jacob, C., Vinod, K., Edwin Pre Suryakumar, E.M., Kothandaraman Manju, R. and Suryakumar, E.** (2001) Incidence and severity of *Corynespora* Leaf Fall (CLF) disease of rubber in coastal Karnataka and north Malabar region of Kerala. *Indian J. Nat. Rubber Res.*, **14**, 137–141.
- Manju, M.J., Benagi, V.I., Shankarappa, T.H., Kuruvilla Jacob, C. and Vinod, K.K.** (2014) Dynamics of *Corynespora* leaf fall and *Colletotrichum* leaf spot diseases of rubber plants (*Hevea brasiliensis*). *J. Mycol. plant Pathol.*, **44**, 108–112.
- Manju, M.J., Benagi, V.I., Shankarappa, T.H., Vinod, K.K., Kuruvilla Jacob, C. and Jacob, C.K.** (2015) Major Diseases of *Hevea brasiliensis* in Rubber Growing Regions of South India. *Environ. Ecol.*, **33**, 1299–1302.
- Manju, M.J., Mushrif, S., Hanumaiah, S., et al.** (2016) Survival ability of *Corynespora cassiicola* in rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) plantations. *Int. J. Life. Sci. Sci. Res.*, **2**, 43–45.
- Manju, M.J., Vinod, K.K., Idicula, S.P., C, K.J., Nazeer, M.A. and Benagi, V.I.** (2010) Susceptibility of *Hevea brasiliensis* Clones to *Corynespora* Leaf Fall disease. *J. Mycol. Plant Pathol.*, **40**, 2010.
- Manning, V.A., Ciuffetti, L.M., Bradford, C., Gilbert, B., Curtis, M. and Tzeng, S.-C.** (2015) Necrotrophic Effector Epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis*-Wheat Interaction S.-H. Yun, ed. *PLoS One*, **10**, e0123548.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P. and Michelmore, R.W.** (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.*, **7**, 212.
- Meng, S., Torto-Alalibo, T., Chibucos, M.C., Tyler, B.M. and Dean, R.A.** (2009) Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms. *BMC Microbiol.*, **9**, S7.
- Mengiste, T.** (2012) Plant Immunity to Necrotrophs. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **50**, 267–94.

- Minic, Z.** (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, **227**, 723–740.
- Minic, Z. and Jouanin, L.** (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol. Biochem.*, **44**, 435–449.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., et al.** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 19613–8.
- Mo, H., Wang, X., Zhang, Y., Yang, J. and Ma, Z.** (2015) Cotton ACAULIS5 is involved in stem elongation and the plant defense response to *Verticillium dahliae* through thermospermine alteration. *Plant Cell Rep.*, **34**, 1975–1985.
- Mo, H., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, G., Zhang, J. and Ma, Z.** (2015) Cotton polyamine oxidase is required for spermine and camalexin signalling in the defence response to *Verticillium dahliae*. *Plant J.*, **83**, 962–975.
- Mohammadi, K., Khalesro, S., Sohrabi, Y. and Heidari, G.** (2011) A review: beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, **1**, 310–319.
- Monaghan, J. and Zipfel, C.** (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **15**, 349–357.
- Montoro, P., Argout, X., Sarah, G., Kuswanhadi, Chaidamsari, T., Rio, M., Leclercq, J. and Ruiz, M.** (2010) Analysis of the clone PB 260 transcriptome and evaluation of the number of genes in *Hevea brasiliensis*.
- Mooibroek, H. and Cornish, K.** (2000) Alternative sources of natural rubber. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 355–365.
- Morkunas, I. and Ratajczak, L.** (2014) The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiol. Plant.*, **36**, 1607–1619.
- Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D. and Doehlemann, G.** (2013) Compatibility in the *Ustilago maydis*–Maize Interaction Requires Inhibition of Host Cysteine Proteases by the Fungal Effector Pit2 J.-R. Xu, ed. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003177.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N. and Deising, H.B.** (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J. Plant Physiol.*, **165**, 41–51.
- Newsam, A.** (1960) Plant pathology division report. *Rubber Res. Inst. Malays.*, 63–70.
- Nghia, N.A., Kadir, J., Sunderasan, E., Puad Abdullah, M., Malik, A. and Napis, S.** (2008) Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, **166**, 189–201.
- Nghia, N.A., Kadir, J., Sunderasan, E., Puad Abdullah, M. and Napis, S.** (2010) Intraspecific variability of *Corynespora cassiicola* inferred from single nucleotide polymorphisms in ITS region of ribosomal DNA. *J. Rubber Res.*, **13**, 257–264.
- Nicholson, R.L.** (1996) Adhesion of Fungal Propagules. In Springer, Dordrecht, pp. 117–134.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. and Kanda, H.** (2000) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.*, **53**, 1–5.
- Okane, I., Toyama, K., Nakagiri, A., Suzuki, K., Srikitikulchai, P., Sivichai, S., Hywel-Jones, N., Potacharoen, W. and Læssøe, T.** (2008) Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. *Mycoscience*, **49**, 359–372.
- Oliveira, R.R., Vida, J.B., Tessmann, D.J., Aguiar, B. de M., Caixeta, M.P. and Barboza, A.L.**

- (2007) Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolates on different host plants. *Summa Phytopathol.*, **33**, 297–299.
- Oliver, R., Lichtenzveig, J., Tan, K.-C., Waters, O., Rybak, K., Lawrence, J., Friesen, T. and Burgess, P.** (2014) Absence of detectable yield penalty associated with insensitivity to Pleosporales necrotrophic effectors in wheat grown in the West Australian wheat belt. *Plant Pathol.*, **63**, 1027–1032.
- Onesirosan, P., Mabuni, C.T., Durbin, R.D., Morin, R.B., Rich, D.H. and Arny, D.C.** (1975) Toxin production by *Corynespora cassiicola*. *Physiol. Plant Pathol.*, **5**, 289–295.
- Ooijen, J.W. Van and Kyazma, B. V.** (2009) MapQTL 6.0, software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of dihaploid species. *Wageningen, Netherlands*.
- Osherov, N. and May, G.S.** (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.*, **199**, 153–160.
- Pandey, D., Rajendran, S.R.C.K., Gaur, M., Sajeesh, P.K. and Kumar, A.** (2016) Plant Defense Signaling and Responses Against Necrotrophic Fungal Pathogens. *J. Plant Growth Regul.*, **35**, 1159–1174.
- Panthou, E.** (2013) *Les plantations Michelin au Viêt-nam La Galipot..*
- Parijs, J. Van, Broekaert, W.F., Goldstein, I.J. and Peumans, W.J.** (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, **183**, 258–264.
- Park, C.-J. and Seo, Y.-S.** (2015) Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *plant Pathol. J.*, **31**, 323–33.
- Park, P. and Ikeda, K.** (2008) Ultrastructural analysis of responses of host and fungal cells during plant infection. *J. Gen. Plant Pathol.*, **74**, 2–14.
- Perfect, S.E. and Green, J.R.** (2001) Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Mol. Plant Pathol.*, **2**, 101–108.
- Petrini, O.** (1991) Fungal Endophytes of Tree Leaves. In Springer, New York, NY, pp. 179–197.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P.** (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, **26**, 509–515.
- Porrás-Alfaro, A. and Bayman, P.** (2011) Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **49**, 291–315.
- Presti, L. Lo, Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S. and Kahmann, R.** (2015) Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 513–45.
- Promptutha, I., Hyde, K.D., McKenzie, E.H.C., Peberdy, J.F. and Lumyong, S.** (2010) Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Divers.*, **41**, 89–99.
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Jeewon, R.** (2007) A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprobes at Host Senescence. *Microb. Ecol.*, **53**, 579–590.
- Pujade-Renaud, V., Sanier, C., Cambillau, L., et al.** (2005) Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, **1727**, 151–161.

- Qi, Y.-X., Zhang, X., Pu, J.-J., Liu, X.-M., Lu, Y., Zhang, H., Zhang, H.-Q., Lv, Y.-C. and Xie, Y.-X.** (2011) Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *Eur. J. Plant Pathol.*, **130**, 83–95.
- Raffaello, T. and Asiegbu, F.O.** (2017) Small secreted proteins from the necrotrophic conifer pathogen *Heterobasidion annosum* s.l. (HaSSPs) induce cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Sci. Rep.*, **7**, 8000.
- Rajalakshmi, V.K. and Kothandaraman, R.** (1996) Current status of *Corynespora* leaf fall in India. The occurrence and management. In *Proceedings of Workshop on Corynespora Leaf Fall Disease of Hevea Rubber*. pp. 37–43.
- Ramakrishnan, T. and Pillay, P.** (1961) Leaf spot of rubber caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Rubber Board Bull.*, **5**, 32–35.
- Risterucci, A.M., Grivet, L., N’Goran, J.A.K., Pieretti, I., Flament, M.H. and Lanaud, C.** (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *TAG Theor. Appl. Genet.*, **101**, 948–955.
- Rocha, A.C.S., Garcia, D., Uetanabaro, A.P.T., Carneiro, R.T.O., Araújo, I.S., Mattos, C.R.R. and Góes-Neto, A.** (2011) Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Divers.*, **47**, 75–84.
- Ron, M. and Avni, A.** (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell*, **16**, 1604–15.
- Roston, R.L., Gao, J., Murcha, M.W., Whelan, J. and Benning, C.** (2012) TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **287**, 21406–15.
- Ryder, L.S. and Talbot, N.J.** (2015) Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **26**, 8–13.
- Salgado, L.R., Koop, D.M., Pinheiro, D.G., et al.** (2014) De novo transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* tissues by RNA-seq and screening for molecular markers.
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M.C., Solomon, P.S. and McDonald, B.A.** (2015) Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genet. Biol.*, **79**, 29–32.
- Schlub, R.L., Smith, L.J., Datnoff, L.E. and Pernezny, K.** (2009) An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. *Acta Hortic.*, 25–28.
- Schmieder, R., Lim, Y., Rohwer, F. and Edwards, R.** (2010) TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics*, **11**, 341.
- Schoch, C.L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., et al.** (2009) A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Stud. Mycol.*, **64**, 1–15.
- Sels, J., Mathys, J., Coninck, B.M.A. De, Cammue, B.P.A. and Bolle, M.F.C. De** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, **46**, 941–950.
- Sengupta, D., Naik, D. and Reddy, A.R.** (2015) Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update. *J. Plant Physiol.*, **179**, 40–55.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., et al.** (2008) Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell*, **20**, 1169–83.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E. and Innes, R.W.** (2003) Cleavage of

- Arabidopsis PBS1 by a Bacterial Type III Effector. *Science* (80-.), **301**, 1230–1233.
- Shi, G., Friesen, T.L., Saini, J., Xu, S.S., Rasmussen, J.B. and Faris, J.D.** (2015) The Wheat Gene Confers Susceptibility on Recognition of the Necrotrophic Effector SnTox7. *Plant Genome*, **8**, 0.
- Shi, J. and Aharoni, A.** (2009) The Arabidopsis DCR Encoding a Soluble BAHD Acyltransferase Is Required for Cutin Polyester Formation and Seed Hydration Properties.
- Shibuya, N. and Minami, E.** (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **59**, 223–233.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., et al.** (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.*, **64**, 204–214.
- Shuib, S.S., Deon, M., Mahyuddin, M.M., Izhar, A., Fumanal, B., Sunderasan, E. and Pujade-Renaud, V.** (2015) Cassiicolin Genes among *Corynespora cassicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *J. Rubb. Res.*, **18**, 109–126.
- Silva, W.P.K., Deraniyagala, S.A., Wijesundera, R.L.C., Karunanayake, E.H. and Priyanka, U.M.S.** (2001) Isolation of scopoletin from leaves of *Hevea brasiliensis* and the effect of scopoletin on pathogens of *H. brasiliensis*. *Mycopathologia*, **153**, 199–202.
- Silva, W.P.K., Deverall, B.J. and Lyon, B.R.** (1998) Molecular, physiological and pathological characterization of corynespora leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathol.*, **47**, 267–277.
- Silva, W.P.K., Karunanayake, E.H., Wijesundera, R.L.C. and Priyanka, U.M.S.** (2003) Genetic variation in *Corynespora cassicola*: a possible relationship between host origin and virulence. *Mycol. Res.*, **107**, 567–571.
- Singh, B. and Sharma, R.A.** (2015) Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, **5**, 129–151.
- Sinulingga, W.S. and Soepena, F.H.** (1996) Current status of *Corynespora* leaf fall in Indonesia. In *Workshop on Corynespora Leaf Fall Disease of Hevea Rubber 16-17 December, 1996, Medan, Indonesia*. pp. 29–36.
- Soedjanaatmadja, U.M., Subroto, T. and Beintema, J.J.** (1995) Processed products of the hevein precursor in the latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *FEBS Lett.*, **363**, 211–213.
- Songmicho, Eunyoungkang, Miseongkim, Seungjinyoo, Yangjuim, Youngcheolkim, Kwangyeolyang, Kilyongkim and Kwangsangkim, Y.** (2010) Jasmonate-dependent expression of agalactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*.
- Stergiopoulos, I., Burg, H.A. van den, Okmen, B., Beenen, H.G., Liere, S. van, Kema, G.H.J. and Wit, P.J.G.M. de** (2010) Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 7610–5.
- Stergiopoulos, I., Collemare, J., Mehrabi, R. and Wit, P.J.G.M. De** (2013) Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, **37**, 67–93.
- Stukenbrock, E.H. and McDonald, B.A.** (2009) Population Genetics of Fungal and Oomycete Effectors Involved in Gene-for-Gene Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **22**, 371–380.
- Sugui, J., Leite, B. and Nicholson, R.** (1998) Partial characterization of the extracellular matrix released onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germlings of *Colletotrichum*

- graminicola. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **52**, 411–425.
- Suryanarayanan, T.S., Murali, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govinda Rajulu, M.B., Venkatesan, G. and Sukumar, R.** (2011) Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodivers. Conserv.*, **20**, 913–928.
- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F.G. and Valent3, B.** (1995) Identification, Cloning, and Characterization of PWLP, a Gene for Host Species Specificity in the Rice Blast Fungus. *Plant Cell*, **7**, 1221–1233.
- Takaoka, S., Kurata, M., Harimoto, Y., Hatta, R., Yamamoto, M., Akimitsu, K. and Tsuge, T.** (2014) Complex regulation of secondary metabolism controlling pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *New Phytol.*, **202**, 1297–1309.
- Tan, A.M., Loo, T.P., Vadivel, G., Bachik, M.R. and Yoon, K.F.** (1992) Survey of major leaf diseases of rubber in peninsular Malaysia. *Plant. Bull. Rubber Res. Inst. Malaysia*, 51–62.
- Tan, K.C., Oliver, R.P., Solomon, P.S. and Moffat, C.S.** (2010) Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence. *Funct. Plant Biol.*, **37**, 907–912.
- Tenhaken, R., Doerks, T. and Bork, P.** (2005) DCD – a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. *BMC Bioinformatics*, **6**, 169.
- Thimann, K. V and Satler, S.** (1979) Relation between senescence and stomatal opening: Senescence in darkness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 2770–2773.
- Thordal-Christensen, H.** (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 351–357.
- Tian, Q., Lu, C., Wang, S., Xiong, Q., Zhang, H., Wang, Y. and Zheng, X.** (2017) Rapid diagnosis of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Eur. J. Plant Pathol.*, **148**, 785–793.
- Tran, D.M.** (2016) *Le test toxinique : une méthode de phénotypage pour l'étude de l'interaction Hevea brasiliensis x Corynespora cassiicola et l'identification des facteurs génétiques de sensibilité.*
- Tran, D.M., Clément-Demange, A., Déon, M., et al.** (2016) Genetic Determinism of Sensitivity to *Corynespora cassiicola* Exudates in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) S. Sarrocco, ed. *PLoS One*, **11**, e0162807.
- Tsuda, K. and Katagiri, F.** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 459–465.
- Tucker, S.L. and Talbot, N.J.** (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **39**, 385–417.
- U'Ren, J.M. and Arnold, A.E.** (2016) Diversity, taxonomic composition, and functional aspects of fungal communities in living, senesced, and fallen leaves at five sites across North America. *PeerJ*, **4**, e2768.
- Uchiyama, A., Shimada-Beltran, H., Levy, A., Zheng, J.Y., Javia, P.A. and Lazarowitz, S.G.** (2014) The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. *Front. Plant Sci.*, **5**, 584.
- Udayanga, D., Liu, X., Mckenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Bahkali, A.H.A. and Hyde, K.D.** (2011) The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Divers.*, **50**, 189–225.
- Vann Loon, L.C. and Strien, E.A. Van** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their

- activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **55**, 85–97.
- Venny Oliveros, J.C.** (2007) An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.
- Vincent, D., Fall, L.A. Du, Livk, A., Mathesius, U., Lipscombe, R.J., Oliver, R.P., Friesen, T.L. and Solomon, P.S.** (2012) A functional genomics approach to dissect the mode of action of the *Stagonospora nodorum* effector protein SnToxA in wheat. *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 467–482.
- Vleeshouwers, V.G.A.A. and Oliver, R.P.** (2014) Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, **27**, 196–206.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Schiff, C. and Somerville, S.C.** (2002) PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 2095–106.
- Vogt, T.** (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant*, **3**, 2–20.
- Walley, J.W., Rowe, H.C., Xiao, Y., et al.** (2008) The Chromatin Remodeler SPLAYED Regulates Specific Stress Signaling Pathways J. L. Dangl, ed. *PLoS Pathog.*, **4**, e1000237.
- Walton, J.D.** (2006) HC-toxin. *Phytochemistry*, **67**, 1406–1413.
- Walton, J.D.** (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell*, **8**, 1723–33.
- Wang, S., Ye, W., Tian, Q., Dong, S. and Zheng, X.** (2017) Rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* using a loop-mediated isothermal amplification assay. *Australas. Plant Pathol.*, **46**, 493–498.
- Wang, X., Shi, M., Wang, D., Chen, Y., Cai, F., Zhang, S., Wang, L., Tong, Z. and Tian, W.-M.** (2013) Comparative Proteomics of Primary and Secondary Luteoids Reveals that Chitinase and Glucanase Play a Crucial Combined Role in Rubber Particle Aggregation in *Hevea brasiliensis*. *J. Proteome Res.*, **12**, 5146–5159.
- Warren-Thomas, E., Dolman, P.M. and Edwards, D.P.** (2015) Increasing Demand for Natural Rubber Necessitates a Robust Sustainability Initiative to Mitigate Impacts on Tropical Biodiversity. *Conserv. Lett.*, **8**, 230–241.
- Webster, C.C. and Baulkwill, W.J.** (1989) *Rubber* Longman Sc.,
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D. and Jin, H.** (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, **342**, 118–23.
- Welch** (1984) A Technique for High-Performance Data Compression. *Computer (Long. Beach. Calif.)*, **17**, 8–19.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. a Guid. to methods Appl.*, **18**, 315–322.
- Widhalm, J.R., Ducluzeau, A.-L., Buller, N.E., Elowsky, C.G., Olsen, L.J. and Basset, G.J.C.** (2012) Phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plants: two peroxisomal thioesterases of lactobacillales origin hydrolyze 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coa. *Plant J.*, **71**, 205–215.
- Winterberg, B., Fall, L.A. Du, Song, X., Pascovici, D., Care, N., Molloy, M., Ohms, S. and Solomon, P.S.** (2014) The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves. *BMC Plant Biol.*, **14**, 215.
- Wit, P.J.G.M. de, Testa, A.C. and Oliver, R.P.** (2016) Fungal Plant Pathogenesis Mediated by Effectors. *Microbiol. Spectr.*, **4**.

- Wolpert, T.J., Dunkle, L.D. and Ciuffetti, L.M.** (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**, 251–85.
- Wu, J., Xie, X., Shi, Y., Chai, A., Wang, Q. and Li, B.** (2018) Variation of cassiicolin genes among Chinese isolates *Corynespora cassiicola*. *J. Microbiol.*, **56**.
- Wycherley, P.R.** (1959) *The Singapore Botanic Gardens and Rubber in Malaya* Garden's B.,.
- Xu, M., Ye, W., Zeng, D., Wang, Y. and Zheng, X.** (2017) Rapid diagnosis of wheat head blight caused by *Fusarium asiaticum* using a loop-mediated isothermal amplification assay. *Australas. Plant Pathol.*, **46**, 261–266.
- Yamada, H., Takahashi, N., Hori, N., Asano, Y., Mochizuki, K., Ohkusu, K. and Nishimura, K.** (2013) Rare case of fungal keratitis caused by *Corynespora cassiicola*. *J. Infect. Chemother.*, **19**, 1167–1169.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E. and Ryan, C.A.** (2010) PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22**, 508–22.
- Yamashita, S., Yamaguchi, H., Waki, T., et al.** (2016) Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*. *Elife*, **5**.
- Yan, X.X., Yu, C.P., Fu, X.A., et al.** (2016) CARD9 mutation linked to *Corynespora cassiicola* infection in a Chinese patient. *Br. J. Dermatol.*, **174**, 176–179.
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y. and Scazzocchio, C.** (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.*, **41**, 973–981.
- Zhang, W.-J., Pedersen, C., Kwaaitaal, M., et al.** (2012) Interaction of barley powdery mildew effector candidate CSEP0055 with the defence protein PR17c. *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 1110–1119.
- Zhang, Z., Friesen, T.L., Xu, S.S., Shi, G., Liu, Z., Rasmussen, J.B. and Faris, J.D.** (2011) Two putatively homoeologous wheat genes mediate recognition of SnTox3 to confer effector-triggered susceptibility to *Stagonospora nodorum*. *Plant J.*, **65**, 27–38.
- Zhao, D.L., Shao, C.L., Gan, L.S., Wang, M. and Wang, C.Y.** (2015) Chromone derivatives from a sponge-derived strain of the fungus *Corynespora cassiicola*. *J. Nat. Prod.*, **78**, 286–93.
- Zhu, X., Li, Z., Xu, H., Zhou, M., Du, L. and Zhang, Z.** (2012) Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistances to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. *Funct. Integr. Genomics*, **12**, 481–488.
- Zipfel, C.** (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.*, **35**, 345–351.

ANNEXES

Annexe 1 – Historique détaillé de la maladie CLF sur hévéa

(André Clément-Demange, communication personnelle)

La maladie CLF a été détectée pour la première fois sur des jeunes plants en pépinières : en 1936 en Sierra Leone (Deighton, 1936), en Inde en 1958 (Ramakrishnan & Pillay, 1961) et en Malaisie en 1960 (Newsam, 1960). Puis, des apparitions sporadiques de la maladie ont été signalées sur différentes plantations d'arbres matures en Inde entre 1969 et 1976 (George & Edathil, 1980). La forme épidémique de la maladie affectant l'arbre adulte et causant des pertes significatives de rendement n'était pas connue avant 1985.

La première épidémie sévère de CLF sur plantations matures a eu lieu au Sri Lanka : d'abord observée en 1985 dans la pépinière du RRSIL (Rubber Research Institute of Sri Lanka) sur le clone RRIC103, elle s'est étendue rapidement ensuite (Jayasinghe, 1997; Liyanage *et al.*, 1986). Le clone RRIC103 était un clone à haut rendement développé en 1958 par le RRSIL et recommandé aux planteurs d'hévéa à partir de 1978 après une expérimentation prolongée. Il a fallu seulement deux ans pour que la maladie se répande dans tout le pays et que 4 500 ha de plantations de ce clone soient affectés en 1987, sur une surface totale de 200 000 ha dans le pays (Liyanage *et al.*, 1989). Pendant cette période, le clone RRIC52, parent maternel de RRIC103, était apparu également très sensible. Une consigne de l'IRRDB (International Rubber Research and Development Board) a conduit à arracher le clone RRIC103, qui n'était encore qu'expérimental dans les autres pays. Il fut notamment arraché dans un champ de clones de la plantation d'Hevecam en 1986. Le clone RRIC110, autre clone prometteur étudié dans plusieurs pays après un échange international, a été également affecté par la CLF, mais ce clone n'était présent que dans des essais ou des petites surfaces monoclonales. Il était de plus très sensible aux dommages dus au vent et n'a jamais été développé.

Après l'épidémie du Sri Lanka sur le clone RRIC103, une alarme au développement de *C. cassiicola* avait été lancée par l'IRRDB, et des signalements de CLF se sont multipliés en Asie : Malaisie 1990-1993 (Tan *et al.*, 1992), Indonésie 1990-1994 (Sinulingga and Soepena, 1996), Inde 1996 et 2015 (Manju *et al.*, 2015; Rajalakshmi and Kothandaraman, 1996), Vietnam 1999 (Dung and Hoan, 2000), Thaïlande 1999 (Chanruang, 2000), Chine 2006 (Jinji *et al.*, 2007). Au nord de Sumatra, une épidémie a sévi de 1998 à 2003, notamment sur les plantations Sipef et Socfindo où le clone PB260 occupait plus de 30 % des surfaces. Cette épidémie, affectait fortement les clones IRCA18, IRCA111, IRCA230 et RRIM712, mais pas RRIC100 ni RRIM921. L'épidémie s'est éteinte en 2003.

En Malaisie et au nord de Sumatra, le clone RRIM600 a été jugé très sensible à *Corynespora*. Ce clone n'est pourtant pas attaqué en Thaïlande où il est prédominant. En 1985, la sensibilité de RRIC103 et KRS21 avait été observée. Ensuite la maladie a été signalée avec indication de sensibilité des clones Songkhla6, PR255, PR305 et RRIT251, mais il semble qu'il n'y ait jamais eu d'épidémie grave.

En Inde, la première épidémie a été observée en 1996 dans l'Etat du Karnataka qui représente avec le Kerala 90 % des surfaces en hévéa du pays. Le clone RRII105, qui est planté sur plus de 60 % de surfaces de cette région, avait été le plus touché. Des épandages de fongicides ont été mis en œuvre jusqu'en 1998 pour contenir la maladie jusqu'à l'arrêt de l'épidémie.

Au Vietnam, la présence de *Corynespora* avait été mentionnée dès 1999, mais semblait anecdotique. En 2009 et 2010, une sévère épidémie a détruit environ 2000 ha, frappant en particulier le clone RRIV4 qui avait été fortement développé au cours des années antérieures, ainsi que RRIV2 et RRIV3. Dans un champ de clones du RRIV planté à Laikhé en 2003, le clone LH94/463 est attaqué régulièrement tous les ans, et c'est le seul clone attaqué dans cet essai.

En Afrique, les rapports concernant *C. cassiicola* proviennent exclusivement de communications fournies par les planteurs d'hévéas partenaires de l'IFC et les agronomes et chercheurs du CIRAD.

L'observation la plus ancienne concerne le clone RRIC103, attaqué dans un champ de clones de la plantation Hevecam (sud Cameroun) en 1986, au moment même où l'alarme était lancée en Asie du fait de l'épidémie au Sri-Lanka. Le clone RRIC103 a donc été arraché à ce moment. Il faut noter que ce clone se trouvait également dans un champ de clones planté en 1980 sur la plantation expérimentale de l'IRCA en Côte d'Ivoire, avec quelques très rares symptômes de *Corynespora* mais pas de véritable attaque. Il avait été décidé de conserver ce clone dans l'essai sous surveillance renforcée. Aucune attaque n'a été rapportée jusqu'en 2001, moment où les agronomes Cirad ont perdu l'accès à cet essai. Il s'est trouvé ensuite que ce clone a été multiplié par erreur sous les faux noms de RRIM703 et de RRIC121 au Nigéria. Dans un CCGE de la plantation d'Utagba Uno, sur deux années successives, en 1994 et 1995, le clone était fortement attaqué en mars-avril après la refoliation, avec jaunissement et chute de toutes les feuilles. Le clone a donc été arraché en 1995. En 2005, au Nigéria, des parcelles supposées de RRIM703 (en fait un mélange de RRIM703 et RRIC103) montraient un mélange en mosaïque d'arbres sains (RRIM703) et d'arbres totalement défoliés (RRIC103).

L'épisode épidémique suivant concerne principalement le clone PB260 sur la plantation Hevecam. Ce clone avait été planté sur un bloc de 600 ha, du fait de sa résistance à *Colletotrichum* vers 1984. L'attaque est intervenue en 1989, provoquant des défoliations totales et

répétées malgré des épandages aériens de fongicides. L'épidémie s'est étendue à plusieurs autres clones, notamment IRCA18 et PB217, mais n'affectait pas GT1 qui représentait 60 % des surfaces de cette plantation. Seul le clone RRIC100, présent dans un champ de clones, apparaissait très résistant, tandis que IRCA19 montrait un comportement assez satisfaisant. L'épidémie s'est éteinte naturellement en 1993. A partir de 1990, PB260 était également fortement attaqué sur la plantation Safacam du Cameroun, assez peu éloignée d'Hevecam, à un âge comparable des arbres (4-5 ans, au moment de la fermeture de la canopée). Il faut noter que le clone PB260 a ensuite été planté sur des surfaces importantes au Gabon, du fait de sa résistance à *Colletotrichum*, notamment sur la plantation de Bitam qui est relativement proche d'Hevecam. Aucune attaque de *Corynespora* n'a été rapportée à ce jour au Gabon. Par ailleurs, tous les essais portant sur des arbres de PB260 issus d'embryogenèse somatique au Nigéria, ont été fortement attaqués par *Corynespora* dès les premières années de croissance.

En Côte d'Ivoire, des attaques étaient apparues sur RRIC110 à partir de 1989. En 1992, dans un champ de clones planté à la Sogb en 1981, les clones IRCA18 et IRCA22 étaient touchés par une attaque foliaire, mais les observations étaient difficiles sur un feuillage situé à 20 mètres de hauteur.

L'épidémie la plus grave en Afrique, car elle semble ne pas s'éteindre, a été initiée au Nigéria à partir de l'année 2000. Elle semble fortement liée à la grande sensibilité du clone IRCA18. Celui-ci a d'abord été fortement attaqué sur les plantations d'Osse River et Okomu dans l'Etat d'Edo (sud-est du Nigéria). Les clones PB217 et PB260 étaient également affectés mais de façon moins importante. La maladie est ensuite apparue sur la plantation d'Araromi, puis sur la plantation Grel au Ghana (2003), puis en Côte d'Ivoire (2008-2009), puis au Libéria (2010). Récemment, on s'est rendu compte que les premières attaques sur IRCA18 en Côte d'Ivoire sont survenues en 2003. Ceci suggère qu'il n'y a probablement pas eu un transfert géographique de la maladie mais une présence endémique et l'éclatement d'attaques dans les zones où IRCA18 était important lorsque les conditions sont devenues favorables à la maladie. Les attaques semblaient toujours survenir sur des parcelles âgées de 4 à 5 ans. Lorsque la maladie s'est développée sur le site de la Sogb (ouest de la Côte d'Ivoire), les parcelles d'IRCA18 âgées de 10 à 15 ans sont restées saines assez longtemps, mais elles présentent maintenant des attaques modérées mais caractéristiques sur les feuilles matures sans entraîner la chute de ces feuilles. Le clone IRCA631, présent sur des surfaces limitées, est apparu aussi sensible que IRCA18. Sur plusieurs plantations, l'éradication de IRCA18 semble avoir stoppé la maladie. Sur d'autres où l'on pratique des traitements fongicides, la maladie perdure.

Sur la plantation Sogb, les clones RRIM802 et RRIM921 sont apparus très sensibles à partir de 2014 sur des parcelles plantées en 2010. Le cas de RRIM921 est surprenant car ce clone avait été développé par Socfindo au Nord Sumatra à partir de 2005 pour sa résistance supposée à *Corynespora*. Toujours à la Sogb, des symptômes caractéristiques abondants ont été observés en jardins à bois de greffe sur les clones CDC56 et FDR5597.

Sur la plantation Scaso (ex Hevego) de Côte d'Ivoire, une attaque violente de *Corynespora* est survenue pour la première fois en 2011, sur des parcelles du clone IRCA18 plantées entre 1989 et 1992, donc sur des arbres âgés d'environ 20 ans. L'observation de ce cas d'attaque soudaine sur des arbres âgés est pour l'instant unique. La maladie a persisté au cours des années suivantes jusqu'à l'arrachage des parcelles d'IRCA18 en novembre 2015. *Corynespora* a également fortement attaqué le clone IRCA707 dans une parcelle de 13 ans d'âge, qui a été aussi arrachée en novembre 2015. Dans un autre essai âgé de plus de 20 ans, IRCA707 conservait un feuillage dense, mais avec une abondance de symptômes de *Corynespora* sur les feuilles des branches basses. Lors de la refoliation 2016, des parcelles âgées du clone PB310 ont à leur tour été fortement attaquées. Les symptômes de *Corynespora* sont très visibles dans cette plantation sur les folioles des jeunes seedlings de repousse entre les lignes d'hévéa. Paradoxalement, le clone IRCA631, présent sur cette plantation dans un champ de clone (Goaa10), est resté sain.

Au Libéria, sur la plantation de Lac, les attaques des parcelles d'IRCA18 ont été généralisées à partir de 2010 et ces parcelles ont été méthodiquement arrachées. A ce jour, *Corynespora* n'est plus perçu comme une menace pour la plantation. Pourtant, une attaque surprenante a été observée sur un jardin à bois de greffe du clone GT1 (clone réputé résistant) et sur une ligne de bordure d'un essai, plantée en GT1. Sur la plantation de Salala, le clone IRCA109 semble montrer une sensibilité modérée sur des parcelles jeunes (années 2016 à 2018), alors qu'il est parfaitement sain dans les plantations Saph de Côte d'Ivoire, notamment dans un essai où IRCA18 et IRCA631 sont présents et fortement attaqués.

Annexe 2 – Prélèvements foliaires pour isolements mycélien, effectués de 2012 à 2017 en Afrique de l'Ouest

Pour chaque prélèvement, il est indiqué la date, le pays d'origine, la plantation, la plante hôte, le clone (si hévéa), l'état des feuilles au moment du prélèvement, le nombre d'isolement, les proportions des genres fongiques isolés et la typologie des souches de *C. cassiicola*.

Les échantillons surlignés en bleu ont été utilisé pour la mise au point du diagnostic moléculaire par qPCR.

Prélèvement des feuilles	Pays	Plantation	Plante	Clone ¹	Etat des feuilles	Nombre d'isolements	Proportions de <i>Corynespora</i> / <i>Colletto</i> / <i>Diaporthe</i> /Autres ²	Typologie des souches de <i>C. cassiicola</i> ³
juillet 2012	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	Traçabilité perdue	malades	7	3/0/1/3 (<i>Xylaria</i> , <i>Coniothyrium</i>)	A/Cas0
juillet 2012	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA18	malades	5	2/1/2/0	A/Cas0
avril 2013	Libéria	LAC	Hévéa	IRCA18	malades	37	10/22/4/1 (<i>Fusarium</i>)	A/Cas0
mai 2013	Nigéria	OKUMU	Hévéa	GT1	malades	8	4/4/0/0	A/Cas0
mai 2013	Nigéria	OKUMU	Hévéa	IRCA18	malades	12	9/2/1/0	C/Cas1 ; B/Cas0
mai 2013	Nigéria	OKUMU	Hévéa	RRIC103	malades	6	2/3/1/0	NC/Cas0
mars 2014	Côte d'Ivoire	Bongo	Hévéa	IRCA18	malades	22	7/13/0/2 (<i>Fusarium</i> , <i>Lasiodiplodia</i>)	A/Cas1, A/Cas0, A/Cas2
mars 2014	Côte d'Ivoire	Bongo	Hévéa	IRCA18	saines	5	1/0/1/3 (<i>Daldinia</i> , <i>Hypoxylon</i>)	A/Cas0
mars 2014	Côte d'Ivoire	Bongo	Hévéa	IRCA840	saines	4	0/1/0/3 (<i>Guignardia</i>)	
mars 2014	Côte d'Ivoire	Bongo	Hévéa	RRIC100	malades	2	0/2/0/0	
mars 2014	Côte d'Ivoire	Bongo	Hévéa	RRIC100	saines	9	1/7/0/1 (<i>Guignardia</i>)	B/Cas0
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	FDR5597	malades	7	0/0/0/7 (<i>Guignardia</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Daldinia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Lasiodiplodia</i>)	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	FDR5597	saines	3	0/2/0/1 (<i>Guignardia</i>)	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA331	malades	15	2/2/1/1 (<i>Guignardia</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Daldinia</i> , <i>Pestalotiopsis</i>)	NC/Cas0
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA331	saines	3	0/0/0/3 (<i>Guignardia</i> , <i>Nigrospora</i>)	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA41	malades	6	1/5/0/3	NC/Cas4
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA41	saines	4	2/0/0/2 (<i>Guignardia</i> , <i>Nigrospora</i>)	NC/Cas0
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	PB217	malades	8	0/4/3/1 (<i>Xylaria</i>)	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	PB217	saines	1	0/1/0/0	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM802	malades	5	1/3/0/1 (<i>Daldinia</i>)	NC/Cas0
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM802	saines	6	0/4/0/2 (<i>Guignardia</i>)	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Manioc	/	malades	4	0/1/0/3 (<i>Xylaria</i> , <i>Pestalotiopsis</i>)	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Manioc	/	saines	2	0/0/0/2 (<i>Guignardia</i>)	

juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Papaye	/	malades	6	1/5/0/0	NC/Cas3
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Papaye	/	saines	9	6/1/0/2 (<i>Guignardia, Nigrospora</i>)	NC/Cas0, NC/Cas4, NC/Cas3, B/Cas5
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Pueraria	/	malades	2	0/1/0/1 (<i>Xylaria</i>)	
juin 2014	Côte d'Ivoire	SOGB	Pueraria	/	saines	1	0/1/0/0	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Ousrou	Hévéa	FDR4575	malades	12	7/1/1/4 (<i>Bipolaris, Periconia, Cercospora</i>)	NC/Cas0, NC/Cas4, A/Cas0, E/Cas0
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Ousrou	Hévéa	FDR4575	saines	5	3/1/0/1 (<i>Xylaria</i>)	NC/Cas0
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Ousrou	Hévéa	IRCA41	malades	7	1/0/4/2 (<i>Guignardia, Hypoxylon</i>)	B/Cas0
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Ousrou	Hévéa	IRCA41	saines	8	0/0/1/7 (<i>Guignardia, Daldinia</i>)	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	IRCA18	malades	15	0/12/3/0	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	IRCA18	saines	8	0/1/0/7 (<i>Guignardia, Daldinia, Myrothecium</i>)	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	RRIC100	malades	8	0/6/1/1 (<i>Daldinia</i>)	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	RRIC100	saines	6	0/2/0/4 (<i>Guignardia, Daldinia</i>)	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	RRIM926	malades	12	9/0/2/1 (<i>Xylaria</i>)	A/Cas0
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	RRIM926	saines	7	1/0/0/6 (<i>Guignardia</i>)	NC /Cas0
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Ousrou	Manioc	/	malades	8	0/3/3/2 (<i>Daldinia</i>)	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Ousrou	Manioc	/	saines	10	0/5/1/4 (<i>Guignardia, Arthrinium, Phoma</i>)	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Papaye	/	malades	7	2/1/0/4 (<i>Daldinia, Cladosporium, Hypoxylon, Nigrospora</i>)	NC/Cas0
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Papaye	/	saines	19	7/9/0/3 (<i>Periconia, Phoma</i>)	NC/Cas0, B/Cas0, F/Cas0, D/Cas4
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Pueraria	/	malades	6	0/3/0/3 (<i>Daldinia</i>)	
déc. 2014	Côte d'Ivoire	Toupah	Pueraria	/	saines	7	0/5/1/1 (<i>Daldinia</i>)	
2014	Nigéria	Osse River	Hévéa	Traçabilité perdue	malades	12	5/7/0/0	C/Cas1
2014	Nigéria	Osse River	Hévéa	RRIC103	malades	19	2/17/0/0	NC /Cas0
avril 2015	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	CDC56	malades	23	9/0/2/12 (<i>Lasiodiplodia, Bipolaris, Choanephora, Curvularia</i>)	A/Cas0, C/Cas1
avril 2015	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	FDR5597	malades	14	14/0/0/0	A/Cas0
oct. 2015	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM802	malades	24	5/4/7/8 (<i>Daldinia, Lasiodiplodia, Xylaria</i>)	A/Cas0, NC/Cas0
mars 2016	Ghana	GREL	Hévéa	CDC56	malades	5	1/3/0/1 (<i>Lasiodiplodia</i>)	A/Cas1

mars 2016	Ghana	GREL	Hévéa	FDR4575	malades	3	1/1/1/0	H/Cas0
mars 2016	Ghana	GREL	Hévéa	GT1	malades	4	1/1/2/0	D/Cas4
mars 2016	Ghana	GREL	Hévéa	IRCA18	malades	6	0/5/0/1 (<i>Daldinia</i>)	
mars 2016	Ghana	GREL	Hévéa	MDX624	malades	5	1/4/0/0	C/Cas1
mars 2016	Ghana	GREL	Hévéa	PB217	malades	6	0/6/0/0	
mars 2016	Ghana	GREL	Hévéa	RRIM2003	malades	5	0/5/0/0	
mars 2016	Libéria	Salala	Hévéa	IRCA109	malades	6	6/0/0/0	A/Cas0
mars 2016	Libéria	Salala	Hévéa	IRCA41	malades	7	1/0/3/3 (<i>Curvularia, Periconia, Cladosporium</i>)	D/Cas0
mars 2016	Libéria	Salala	Hévéa	Mixed	malades	7	5/2/0/2 (<i>Guignardia</i>)	A/Cas0
mars 2016	Libéria	Salala	Hévéa	RRIC100	malades	6	0/1/1/4 (<i>Curvularia, Lasiodiplodia, Guignardia</i>)	
mars 2016	Côte d'Ivoire	SCASO	Hévéa	IRCA18	malades	19	8/7/1/3 (<i>Fusarium, Lophiostoma, Guignardia</i>)	A/Cas0
mars 2016	Côte d'Ivoire	SCASO	Hévéa	PB217	malades	3	1/2/0/0	NC/Cas0
mars 2016	Côte d'Ivoire	SCASO	Hévéa	PB310	malades	5	2/2/1/0	A/Cas0
mars 2016	Côte d'Ivoire	SCASO	Hévéa	IRCA707	malades	5	2/1/2/0	A/Cas0
mars 2016	Côte d'Ivoire	SCASO	Papaye	/	malades	5	3/0/2/0	A/Cas0
mai 2016	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	PB260xRRIM600 (629)	malades	5	0/4/1/0	
mai 2016	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	PB260xRRIM600 (629)	saines	3	1/0/0/2 (<i>Guignardia</i>)	NC/Cas0
mai 2016	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	PB260xRRIM600 (507)	malades	9	2/1/1/5 (<i>Guignardia, Neofusicoccum</i>)	B/Cas0, NC/Cas0
mai 2016	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	PB260xRRIM600 (507)	saines	3	1/0/0/2 (<i>Guignardia, Pestalotiopsis</i>)	B/Cas0
mai 2016	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	PB260xRRIM600 (820)	malades	5	3/2/0/0	B/Cas0, NC/Cas0
mai 2016	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	PB260xRRIM600 (820)	saines	3	0/0/0/3 (<i>Guignardia</i>)	
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA18	malades	3	0/0/0/3 (<i>Guignardia</i>)	
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA18	saines	7	0/4/0/3 (<i>Guignardia</i>)	
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA41	malades	4	0/1/2/1 (<i>Fusarium</i>)	
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA41	saines	4	0/4/0/0	
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	PR107	malades	3	1/0/1/1 (<i>Guignardia</i>)	NC/Cas0
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM802	malades	15	2/10/0/3 (<i>Guignardia, Curvularia,</i>	A/Cas1, NC/Cas0

Mycoleptodiscus)

juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Papaye	/	malades	4	3/0/1/0	NC/Cas0
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Papaye	/	saines	7	2/2/1/2 (<i>Nigrospora</i>)	B/Cas0
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Pueraria	/	malades	3	0/0/0/3 (<i>Fusarium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Pestalotiopsis</i>)	
juin 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Pueraria	/	saines	4	0/1/2/1 (<i>Fusarium</i>)	
nov. 2016	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	IRCA18	malades	42	15/5/9/13 (<i>Guignardia</i> , <i>Daldinia</i> , <i>Leptostroma</i>)	A/Cas0, NC/Cas0, A/Cas2, E/Cas0
déc. 2016	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM921	malades	38	12/0/14/12 (<i>Guignardia</i> , <i>Daldinia</i> , <i>Hypoxylon</i>)	C/Cas1, B/Cas0, A/Cas0, C/Cas0, D/Cas0, D/Cas4, NC/Cas0, NC/Cas4
mars 2017	Côte d'Ivoire	Bongo	Hévéa	IRC631	malades	6	0/6/0/0	
mars 2017	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM802	malades	17	11/6/0/0	A/Cas1, C/Cas1
mars 2017	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM921	malades	27	8/19/0/0	C/Cas1, A/Cas1, A/Cas0
mars 2017	Côte d'Ivoire	Toupah	Hévéa	IRCA18	malades	4	4/0/0/0	A/Cas1
nov. 2017	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM802	malades	28	0/0/5/23 (<i>Daldinia</i> , <i>Xylaria</i>)	
nov. 2017	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	RRIM921	malades	22	0/0/6/16 (<i>Daldinia</i> , <i>Xylaria</i>)	
nov. 2017	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	IRCA18	malades	19	2/0/4/13 (<i>Daldinia</i> , <i>Lasiodiplodia</i> , <i>Xylaria</i>)	A/Cas0
nov. 2017	Côte d'Ivoire	SOGB	Hévéa	GT1	malades	8	0/0/2/6 (<i>Daldinia</i> , <i>Xylaria</i>)	

¹Les prélèvements PB260xRRIM600 sont issus d'un croisement entre ces deux clones. Leur nom de code est indiqué entre parenthèse.

²Le nombre de souches isolées pour chaque prélèvement a été détaillé seulement pour les trois genres les plus représentés, associée à un code couleur : *Corynespora* (bleu), *Colletotrichum* (vert) et *Diaporthe* (violet). Les proportions des autres genres ont été rassemblées dans "autres", dont les noms de genre ont été indiqués entre parenthèse.

³La typologie des souches (clade phylogénétique et classe toxinique) a été déterminée selon Déon *et al.* (2014).

NC, non classé.

Annexe 3 – Liste des amorces utilisées dans ce manuscrit

Nom	Séquence (5' ... 3')	Description
IDENTIFICATION MOLECULAIRE FONGIQUE et PHYLOGENIE DES SOUCHES DE <i>CORYNESPORA CASSIICOLA</i>		
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Amplification des régions ITS1, 5.8S et ITS2 de l'ADN ribosomique des eucaryotes (White <i>et al.</i> , 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Cc-GA4-F	CCTGCTCCGACTTTGTTGAG	Amplification du locus <i>ga4</i> de <i>C. cassiicola</i> (Dixon <i>et al.</i> , 2009)
Cc-GA4-R	GTCTGGGAGCAGCAAAGACT	
ACT-512-F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Amplification du gène <i>ACT1</i> de <i>C. cassiicola</i> (Dixon <i>et al.</i> , 2009)
ACT-783-R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
Cc-CAA5-F	GTCCACAAGTGGAACCTCGT	Amplification du locus <i>cca5</i> de <i>C. cassiicola</i> (Dixon <i>et al.</i> , 2009)
Cc-CAA5-R	CCTCGTCTGCCAGTTCTTCT	
F18	CCCAAGATACATGTTTTGAATGT	Amplification du gène <i>Cas1</i> (Déon <i>et al.</i> , 2014)
R27	CCACACAAAGCAAGATACAGAATGAGC	
F17	GGATTTGCCTGAGATCCTA	Amplification du gène <i>Cas2</i> (Déon <i>et al.</i> , 2014)
R24	CAAACAATGCTAACCAAACAAAC	
F20	GTCGGCTAACTTGGGAAAACTCT	Amplification des gènes <i>Cas3</i> et <i>Cas4</i> (Déon <i>et al.</i> , 2014)
R28	GCAGGAAGCAAAACACAGAACAAG	
F19	CGGGGAGGTATCAGGTGTGAGATA	Amplification du gène <i>Cas5</i> (Déon <i>et al.</i> , 2014)
R26	CAGAACAAGCCAAAAGAGAACTAC	
F16	GCTTGATTTGCCTGTGAGATACT	Amplification du gène <i>Cas6</i> (Déon <i>et al.</i> , 2014)
R25	AAAACGATGCTAAACAAAAGGA	
Cas7-F	GAGCATCTGGCATTTCCTCT	Amplification du gène <i>Cas7</i> (Lopez <i>et al.</i> , 2018)
Cas7-R	TTAGGGGGAAGAGATTTGCAT	

DIAGNOSTIC MOLECULAIRE PAR qPCR		
qCaa5-F4	ATCATTCGCGCTAGGCTACC	Identification par qPCR des souches de <i>C. cassiicola</i> (non publié)
qCaa5-R4	ATTGCGCGTCGAGGTGATTA	
qGLOE-F1	GGCGGGTAGGGTCTCCG	Identification par qPCR des souches de <i>Colletotrichum</i> groupe 1 (Garrido <i>et al.</i> , 2009)
qGLOE-R1	AGAAGAAACGTCGTTAAATCAG	
qCOL SPE-F2	TCGAGTTACCGCTCCTTATAA	Identification par qPCR des souches de <i>Colletotrichum</i> groupe 2 (non publié)
qCOL SPE-R2	TGGGGCGCGCCGAGAVGG	
qCOL SPE-F3	AGGGGAAGCCTCTCGCGG	Identification par qPCR des souches de <i>Colletotrichum</i> groupe 3 (non publié)
qCOL SPE-R3	ACGTCGTGTAATAGAGTTTGTT	
IDENTIFICATION DE L'EXPRESSION DU GENE CASI		
Cc-qCas1-F1	ACTTGCGTAAAGCTGTGTCAATTTTCG	Expression du gène <i>Cas1</i> de <i>C. cassiicola</i> par qPCR (Déon <i>et al.</i> , 2012a)
Cc-qCas1-R1	CATCCCGAACAAGCCCAAGA	
Cc-qEF1a-F1	CACCGTCATTGACGCCCCC	Expression du gène EF1 α (gène de référence) de <i>C. cassiicola</i> par qPCR (Déon <i>et al.</i> , 2012a)
Cc-qEF1a-R1	GCCTCGAACTACCAGTACC	
Cc-qActin-F1	CATTGTCATGTCTGGTGGTA	Expression du gène <i>actine</i> (gène de référence) de <i>C. cassiicola</i> par qPCR (Déon <i>et al.</i> , 2012a)
Cc-qActin-R1	TGATCTTGACCTTCATCGAG	
Cc-Btub-F1	TGGAGCGCATGAACGTCTACT	Expression du gène β -tubuline (gène de référence) de <i>C. cassiicola</i> par qPCR (non publié)
Cc-Btub-R1	TCGGGACGGAAAAGCTGACC	
CONSTRUCTION ET CARACTERISATION DU MUTANT DE DELETION CASI		
P1	GATCGGGAGGCGTACTATC	Amplification de la séquence en 5' du gène <i>Cas1</i> (Guillemette <i>et al.</i> , 2011)
P2	GCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAATGTATAGGACAGATTTTCAAGA	
P3	GGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAGCGGCCCAAGATAGTGTA	Amplification de la séquence en 3' du gène <i>Cas1</i> (Guillemette <i>et al.</i> , 2011)
P4	CTGCCTAACGTATTTGCGACA	
M13F	TGTAACGACGGCCAGTGAGCGC	Amplification du gène HygroB conférant la résistance à

M13R	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	l'hygromycine (Sweigard <i>et al.</i> , 1995)
P7	CGGGAGCTTTGGATGGCGA	Amplification de toute la cassette de délétion (Guillemette <i>et al.</i> , 2011)
P8	GACAGACCCTTGCAGTTTTTC	
P9	AAGGGCCGGAAGAAGATACGA	Amplification de la séquence 5' et du CDS partiel du gène <i>CasI</i> (non publié)
P10	CAGCAACGGCTGCTACAAAAG	
P11	CTGCTTTTGTAGCAGCCGTTG	Amplification du CDS partiel et de la séquence 3' du gène <i>CasI</i> (non publié)
P12	TCGTGAGGGCAGAAGAAGCTA	
HygR-F3	CGTTATGTTTATCGGCAC	Séquençage du gène <i>HygroB</i> conférant la résistance à l'hygromycine (Sweigard <i>et al.</i> , 1995 ; Guillemette <i>et al.</i> , 2011)
HygR-R1	CATCGACCCTGCGCCCAA	
PTrpC-F1	GGCTTGGCTGGAGCTAGTG	
DOUBLE HYBRIDE EN LEVURES		
pGAD-S	GATGATGAAGATACCCACCAAA	Spécifiques du plasmide pGADT7. Permet de s'assurer que l'insert proie est bien présent dans le plasmide (Clontech)
pGAD-AS	CGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT	
Y2H-Cas1-F1	CATGGAGGCCGAATTCAGACTTGCGTAAGCTGTGTCAAT	Spécifique du plasmide appât pGBKT7. Permet la recombinaison homologue de <i>CasI</i> dans le plasmide (Clontech)
Y2H-Cas1-R1	GCAGGTCGACGGATCCACATCCCGAACAAGCCCAAGAATT	

Annexe 4 – Liste des souches utilisées pour les analyses phylogénétiques

Toutes les souches appartiennent à l'espèce *C. cassiicola* sauf D58-NE-Ts (*C. olivacea*), utilisée comme groupe externe. Les isolats de notre collection commencent tous par la lettre "C" (pour *Corynespora*), suivi des premières lettres du pays dont ils sont issus (Ci pour Côte d'Ivoire, Nig pour Nigéria, Lib pour Libéria ou Cha pour Ghana) puis d'un numéro à trois chiffres dont le premier correspond à l'année de l'isolement (2 pour 2012, 3 pour 2013, etc) et les deux autres correspondent au numéro de la souche. Les noms d'origine des autres isolats ont été conservés. Chaque nom de souche intègre les initiales de la plante hôte à partir de laquelle elle a été isolée. Le continent, le pays d'origine, la plante hôte et l'état sanitaire des feuilles au moment du prélèvement (malade ou saine) ont été indiqués. Les clades phylogénétiques ont été obtenus à partir de l'alignement de quatre séquences concaténées (ADNr *ITS*, *caa5*, *ga4* et *act1*) comme décrit dans Déon *et al.* (2014). La classe toxinique correspond à une ou deux isoforme(s) de cassiicoline, identifiée par PCR. Cas0 signifie qu'aucun gène de cassiicoline n'a été détecté. NC, non classé. ND, non déterminé.

Nom des souches	Continent	Pays d'origine	Plante hôte	Etat des feuilles	Clade	Classe toxinique
1-PH-Hb	Asie	Philippines	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
2-CA-Hb	Afrique	Cameroun	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	D	Cas0
3-CA-Hb	Afrique	Cameroun	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
4-CA-Hb	Afrique	Cameroun	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
5-CA-Hb	Afrique	Cameroun	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	D	Cas0
7-GA-Hb	Afrique	Gabon	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
8-GA-Hb	Afrique	Gabon	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
9-GA-Hb	Afrique	Gabon	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
10-IN-Hb	Asie	Inde	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
11-IN-Hb	Asie	Inde	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
12-IN-Hb	Asie	Inde	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
13-IN-Hb	Asie	Inde	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
14-IN-Hb	Asie	Inde	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
15-SL-Hb	Asie	Sri Lanka	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
16-SL-Hb	Asie	Sri Lanka	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
17-SL-Hb	Asie	Sri Lanka	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
18-SL-Hb	Asie	Sri Lanka	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
19-SL-Hb	Asie	Sri Lanka	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
20-TH-Hb	Asie	Thaïlande	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	F	Cas0
21-TH-Hb	Asie	Thaïlande	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
22-TH-Hb	Asie	Thaïlande	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	F	Cas0
23-TH-Hb	Asie	Thaïlande	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	F	Cas0
24-TH-Hb	Asie	Thaïlande	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
25-TH-Hb	Asie	Thaïlande	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
26-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
27-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
28-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
29-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
30-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
31-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
32-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
33-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
34-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
35-GH-Hb	Afrique	Ghana	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
36-GH-Hb	Afrique	Ghana	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
37-GH-Hb	Afrique	Ghana	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
38-BR-Hb	Amérique	Brésil	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	G	Cas0
39-BR-Hb	Amérique	Brésil	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas3
40-BR-Hb	Amérique	Brésil	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas3
41-BR-Hb	Amérique	Brésil	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	D	Cas4
42-BR-Hb	Amérique	Brésil	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas0
43-BR-Hb	Amérique	Brésil	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	D	Cas4
44-BR-Cp	Amérique	Brésil	<i>Carica papaya</i>	malades	A	Cas0
45-JA-Cp	Amérique	Jamaïque	<i>Carica papaya</i>	malades	A	Cas0

46-BR-Cb	Amérique	Brésil	<i>Coleus barbatus</i>	malades	NC	Cas0
47-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
48-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
49-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
50-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2+7
51-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
52-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2+7
53-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2+7
54-BR-Cs	Amérique	Brésil	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
55-BR-Gm	Amérique	Brésil	<i>Glycine max</i>	malades	A	Cas2+6
56-BR-Gm	Amérique	Brésil	<i>Glycine max</i>	malades	A	Cas2
57-BR-Gm	Amérique	Brésil	<i>Glycine max</i>	malades	A	Cas2+6
58-BR-Gm	Amérique	Brésil	<i>Glycine max</i>	malades	A	Cas2
59-BR-Gh	Amérique	Brésil	<i>Gossypium hirsutum</i>	malades	A	Cas2+6
60-IN-He	Asie	Inde	<i>Hibiscus esculentus</i>	malades	B	Cas0
61-BR-Hm	Amérique	Brésil	<i>Hydrangea macrophylla</i>	malades	C	Cas0
62-BR-Ls	Amérique	Brésil	<i>Lactuca sativa</i>	malades	A	Cas0
63-BR-Lc	Amérique	Brésil	<i>Lantana camara</i>	malades	A	Cas2
64-BR-Le	Amérique	Brésil	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	NC	Cas0
65-BR-Le	Amérique	Brésil	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	NC	Cas0
66-BR-Le	Amérique	Brésil	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	NC	Cas0
67-BR-Le	Amérique	Brésil	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	NC	Cas0
68-BR-Mg	Amérique	Brésil	<i>Malpighia glabra</i>	malades	G	Cas0
69-BR-Ph	Amérique	Brésil	<i>Piper hispidinervum</i>	malades	NC	Cas0
6-CA-Hb	Afrique	Cameroun	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
70-BR-Vc	Amérique	Brésil	<i>Vernonia cinerea</i>	malades	A	Cas2
BJ5-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
C68-6-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
C68-8-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CBN5-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CBPP2-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
CBS6-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi201-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi205-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi401-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	B	Cas0
CCi402-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas2
CCi403-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi404-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	A	Cas0
CCi405-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CCi410-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	malades	NC	Cas3
CCi411-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	NC	Cas4
CCi412-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	NC	Cas0
CCi413-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	NC	Cas3
CCi414-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	C	Cas0
CCi415-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	NC	Cas0
CCi416-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	B	Cas5
CCi417-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi418-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi420-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas4
CCi421-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas0
CCi422-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas0
CCi423-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	I	Cas4
CCi424-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi425-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi426-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	I	Cas0
CCi427-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi428-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi429-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	E	Cas0
CCi430-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas0
CCi431-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas0
CCi433-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0

CCi434-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi438-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi443-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas0
CCi444-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	malades	NC	Cas0
CCi445-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	malades	NC	Cas0
CCi446-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	D	Cas4
CCi447-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	NC	Cas0
CCi448-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	NC	Cas0
CCi449-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	B	Cas0
CCi450-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	NC	Cas0
CCi451-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	F	Cas0
CCi452-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	B	Cas0
CCi501-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CCi502-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi503-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi506-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi508-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi510-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi512-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi522-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi524-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi528-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi601-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CCi602-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	saines	B	Cas0
CCi603-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	malades	NC	Cas0
CCi604-Cp	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Carica papaya</i>	malades	NC	Cas0
CCi605-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi606-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi607-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi608-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi611-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi612-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi613-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi614-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi615-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi616-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi617-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	saines	NC	Cas0
CCi618-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
CCi619-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi620-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
CCi621-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
CCi622-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi623-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi624-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi625-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi626-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi628-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi630-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi632-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi634-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi635-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi636-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	E	Cas0
CCi637-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi701-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CCi702-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
CCi703-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CCi704-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas0
CCi705-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	D	Cas0
CCi706-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0
CCi707-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	D	Cas4
CCi708-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas0

CCi709-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas4
CCi710-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CCi714-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CCi715-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CCi719-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CCi720-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CCi721-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CCi725-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CCi727-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CCi728-Hb	Afrique	Côte d'Ivoire	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CD3-Pv	Asie	Chine	<i>Phaseolus vulgaris</i>	malades	A	Cas0
CGha601-Hb	Afrique	Ghana	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	D	Cas4
CGha602-Hb	Afrique	Ghana	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas1
CGha603-Hb	Afrique	Ghana	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CGha604-Hb	Afrique	Ghana	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	H	Cas0
CKT05C-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CKT05D-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	NC	Cas4
CKT05F-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CKT1-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CLib307-Hb	Afrique	Libéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLib601-Hb	Afrique	Libéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLib603-Hb	Afrique	Libéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	D	Cas0
CLib604-Hb	Afrique	Libéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLKK1-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLN11-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLN16-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLN23-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLN4-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CLN9-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CNig301-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CNig304-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
CNig312-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CNig314-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	I	Cas0
CNig401-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	I	Cas0
CNig403-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CNig405-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CNig406-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CNig407-Hb	Afrique	Nigéria	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	C	Cas1
CSB05A-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CSB05B-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CSB11-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CSB15-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CSB16-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CSB3-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CSB5-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CSB6-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
CSD1-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas0
CTD1-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
CTD2-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
D1-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	ND
D2-MA-Hb	Asie	Malaisie	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	ND
D3-SA-Ag	Asie	Saipan	<i>Asystasia gangetica</i>	malades	NC	ND
D4-GU-Ba	Océanie	Guam	<i>Bidens alba</i>	malades	A	ND
D5-GU-Cm	Océanie	Guam	<i>Calopogonium mucunoides</i>	malades	F	ND
D6-GU-Ca	Océanie	Guam	<i>Capsicum annum</i>	saines	A	ND
D7-GU-Cp	Océanie	Guam	<i>Carica papaya</i>	malades	A	ND
D8-PA-Cp	Océanie	Palaos	<i>Carica papaya</i>	malades	A	ND
D9-PA-Cp	Océanie	Palaos	<i>Carica papaya</i>	malades	A	ND
D10-PA-Cp	Océanie	Palaos	<i>Carica papaya</i>	malades	A	ND
D11-SA-Cp	Océanie	Saipan	<i>Carica papaya</i>	saines	A	ND

D12-SA-Cp	Océanie	Saipan	<i>Carica papaya</i>	malades	A	ND
D13-YA-Cp	Océanie	Yap	<i>Carica papaya</i>	malades	A	ND
D14-AS-Cp	Océanie	Samoa américaines	<i>Carica papaya</i>	malades	F	ND
D15-FL-Cr	Amérique	Floride	<i>Catharanthus roseus</i>	malades	B	ND
D16-PA-Cr	Océanie	Palaos	<i>Catharanthus roseus</i>	malades	A	ND
D17-SA-Cg	Océanie	Saipan	<i>Coccinia grandis</i>	saines	F	ND
D18-GU-Cv	Océanie	Guam	<i>Codiaeum variegatum</i>	saines	A	ND
D19-AS-Cs	Océanie	Samoa américaines	<i>Cucumis sativus</i>	malades	NC	ND
D20-AS-Cs	Océanie	Samoa américaines	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	ND
D21-PA-Cs	Océanie	Palaos	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	ND
D22-SA-Cs	Asie	Saipan	<i>Cucumis sativus</i>	malades	NC	ND
D23-YA-Cs	Océanie	Yap	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	ND
D24-YA-Cs	Océanie	Yap	<i>Cucumis sativus</i>	malades	B	ND
D25-AS-Cpe	Océanie	Samoa américaines	<i>Cucurbita pepo</i>	malades	F	ND
D26-AS-Cpe	Océanie	Samoa américaines	<i>Cucurbita pepo</i>	malades	A	ND
D27-GU-Eh	Océanie	Guam	<i>Euphorbia heterophylla</i>	saines	H	ND
D28-GU-Em	Océanie	Guam	<i>Euphorbia milii</i>	malades	NC	ND
D29-BR-Gm	Amérique	Brésil	<i>Glycine max</i>	malades	A	ND
D30-GU-Gm	Océanie	Guam	<i>Glycine max</i>	saines	F	ND
D31-YA-Ib	Océanie	Yap	<i>Ipomoea batatas</i>	saines	B	ND
D32-GU-Jc	Océanie	Guam	<i>Jatropha curcas</i>	saines	H	ND
D33-BR-Lc	Amérique	Brésil	<i>Lantana camara</i>	malades	NC	ND
D34-FL-Lc	Amérique	Floride	<i>Lantana camara</i>	malades	NC	ND
D35-GU-Lc	Océanie	Guam	<i>Lantana camara</i>	malades	A	ND
D36-SA-La	Océanie	Saipan	<i>Luffa acutangula</i>	saines	F	ND
D37-GU-Ma	Océanie	Guam	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	malades	A	ND
D38-GU-Me	Océanie	Guam	<i>Manihot esculenta</i>	saines	H	ND
D39-AS-Ob	Océanie	Samoa américaines	<i>Ocimum basilicum</i>	malades	F	ND
D40-SA-Pl	Océanie	Saipan	<i>Pachystachys lutea</i>	malades	F	ND
D41-GU-Pf	Océanie	Guam	<i>Passiflora foetida</i>	saines	F	ND
D42-PA-Pm	Océanie	Palaos	<i>Pilea microphylla</i>	malades	B	ND
D43-GU-Pn	Océanie	Guam	<i>Pilea nummulariifolia</i>	saines	B	ND
D44-PA-Pbe	Océanie	Palaos	<i>Piper betle</i>	saines	B	ND
D45-FL-Pb	Amérique	Floride	<i>Plectranthus barbatus</i>	malades	A	ND
D46-GU-Si	Océanie	Guam	<i>Saintpaulia ionantha</i>	malades	E	ND
D47-SA-Si	Océanie	Saipan	<i>Saintpaulia ionantha</i>	malades	F	ND
D48-TE-Si	Amérique	Tennessee	<i>Saintpaulia ionantha</i>	malades	E	ND
D49-YA-Si	Océanie	Yap	<i>Saintpaulia ionantha</i>	malades	B	ND
D50-AS-Sl	Océanie	Samoa américaines	<i>Solanum lycopersicum</i>	malades	F	ND
D51-AS-Sl	Océanie	Samoa américaines	<i>Solanum lycopersicum</i>	malades	F	ND
D52-GU-Sl	Océanie	Guam	<i>Solanum lycopersicum</i>	malades	NC	ND
D53-YA-Sl	Océanie	Yap	<i>Solanum lycopersicum</i>	malades	F	ND
D54-AS-Sm	Océanie	Samoa américaines	<i>Solanum melongena</i>	malades	H	ND
D55-GU-Tl	Océanie	Guam	<i>Teramnus labialis</i>	saines	F	ND
D56-AS-Vu	Océanie	Samoa américaines	<i>Vigna unguiculata</i>	malades	A	ND
D57-PA-Vu	Océanie	Palaos	<i>Vigna unguiculata</i>	malades	NC	ND
D58-NE-Ts	Europe	Pays-Bas	<i>Tilia spp.</i>	malades	ND	ND
DX-Sv	Asie	Chine	<i>Syringa vulgaris</i>	malades	A	Cas0
FQ1-Le	Asie	Chine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	NC	Cas0
FQ10-Le	Asie	Chine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	F	Cas0
FQ12-Le	Asie	Chine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	NC	Cas0
FQ16-Le	Asie	Chine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	A	Cas0
FQ18-Le	Asie	Chine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	NC	Cas0
FQ2-Cs	Asie	Chine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	malades	F	Cas0
GD1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
GS1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
HB1-Hb	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
HCCHN05-Hb	Asie	Chine	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
HCCHN42-	Asie	Chine	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0

Hb						
HCCYN-Hb	Asie	Chine	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	B	Cas5
HCCYN61-Hb	Asie	Chine	<i>Hevea brasiliensis</i>	malades	A	Cas0
HN2-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
HN4-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas0
HuB1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
JD1-Vu	Asie	Chine	<i>Vigna unguiculata</i>	malades	A	Cas2
JD6-Vu	Asie	Chine	<i>Vigna unguiculata</i>	malades	A	Cas0
KG1-Mc	Asie	Chine	<i>Momordica charantia</i>	malades	A	Cas2
KG3-Mc	Asie	Chine	<i>Momordica charantia</i>	malades	NC	Cas0
KHDL-Ap	Asie	Chine	<i>Aeschynanthus pulcher</i>	malades	A	Cas2
LJ1-Ca	Asie	Chine	<i>Capsicum annuum</i>	malades	NC	Cas0
LN4-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
LN7-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas0
NM1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas0
NM3-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	NC	Cas0
QZ1-Sm	Asie	Chine	<i>Solanum melongena</i>	malades	E	Cas0
QZ16-Sm	Asie	Chine	<i>Solanum melongena</i>	malades	A	Cas2
QZ5-Sm	Asie	Chine	<i>Solanum melongena</i>	malades	E	Cas0
QZ8-Sm	Asie	Chine	<i>Solanum melongena</i>	malades	A	Cas2
SC1-Ls	Asie	Chine	<i>Lactuca sativa</i>	malades	A	Cas0
SD1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
SD29-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	NC	Cas0
SJD1-Pv	Asie	Chine	<i>Phaseolus vulgaris</i>	malades	A	Cas0
TJ1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas0
TTN-Sr	Asie	Chine	<i>Strelitzia reginae</i>	malades	F	Cas0
WJ1-Ls	Asie	Chine	<i>Lactuca sativa</i>	malades	NC	Cas0
WZ1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
YCH-Ss	Asie	Chine	<i>Salvia splendens</i>	malades	B	Cas0
YD1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2
YPH-Ep	Asie	Chine	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	malades	A	Cas0
ZBTK1-Gb	Asie	Chine	<i>Gynura bicolor</i>	malades	A	Cas2.2
ZJ1-Cs	Asie	Chine	<i>Cucumis sativus</i>	malades	A	Cas2

Annexe 5 – Data and statistical significance of Figures 41 to 44 (Chapitre 2)

Samples highlighted in gray are found twice (Figures 41 and 43).

Figure	Detached leaves Yes/No	Clone	Treatment	[Conidia] ¹ conidia/µl	Scraping ²	Dpi ³ (days)	Necrosis ⁴ (mm ²)	SE ⁵	Statistical significance ⁶				
									Fig. 41	Fig. 42	Fig. 43	Fig. 44	
Fig. 41	Yes	IRCA631	CCP	5	No	4	24,6	2	a				
Fig. 41	yes	IRCA18	CCP	5	No	4	16,9	1,1	b				
Fig. 41	Yes	PB260	CCP	5	No	4	16,2	0,9	b				
Fig. 41	yes	PB217	CCP	5	No	4	15	1,2	b				
Fig. 41	Yes	RRIC100	CCP	5	No	4	2,9	0,5	c				
Fig. 41	yes	IRCA41	CCP	5	No	4	2,8	0,4	c				
Fig. 41	Yes	RRIM600	CCP	5	No	4	1,3	0,2	c				
Fig. 41	Yes	GT1	CCP	5	No	4	0	0	c				
Fig. 41	yes	IRCA631	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	0,4	0,1	c				
Fig. 41	Yes	IRCA18	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	0,2	0	c				
Fig. 41	yes	PB260	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	0,8	0,2	c				
Fig. 41	Yes	PB217	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	0,5	0,1	c				
Fig. 41	Yes	RRIC100	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	0,9	0,2	c				
Fig. 41	yes	IRCA41	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	0,2	0,1	c				
Fig. 41	yes	RRIM600	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	1	0,2	c				
Fig. 41	yes	GT1	<i>ccpΔcas1</i>	5	No	4	0	0	c				
Fig. 41	Yes	GT1	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 41	yes	IRCA18	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 41	Yes	IRCA41	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 41	yes	IRCA631	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 41	Yes	PB217	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 41	yes	PB260	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 41	Yes	RRIC100	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 41	yes	RRIM600	water	0	No	4	0	0	c				
Fig. 42	Yes	IRCA631	CCP	50	No	4	79,5	3,4				b	
Fig. 42	yes	PB217	CCP	50	No	4	71,7	2,7				bc	
Fig. 42	Yes	GT1	CCP	50	No	4	0	0				h	
Fig. 42	yes	IRCA631	<i>ccpΔcas1</i>	50	No	4	6,4	0,4				g	
Fig. 42	Yes	PB217	<i>ccpΔcas1</i>	50	No	4	10	0,6				fg	

Fig. 42	yes	GT1	<i>ccpΔcasI</i>	50	No	4	0	0	h
Fig. 42	Yes	IRCA631	water	0	No	4	0	0	h
Fig. 42	yes	PB217	water	0	No	4	0	0	h
Fig. 42	yes	GT1	water	0	No	4	0	0	h
Fig. 42	yes	IRCA631	CCP	50	No	7	230,2	6,4	a
Fig. 42	Yes	PB217	CCP	50	No	7	238,1	7,3	a
Fig. 42	Yes	GT1	CCP	50	No	7	33,6	6,8	de
Fig. 42	yes	IRCA631	<i>ccpΔcasI</i>	50	No	7	16,9	1,7	ef
Fig. 42	Yes	PB217	<i>ccpΔcasI</i>	50	No	7	56,3	2,5	c
Fig. 42	yes	GT1	<i>ccpΔcasI</i>	50	No	7	35,7	4,6	d
Fig. 42	yes	IRCA631	water	0	No	7	0	0	h
Fig. 42	Yes	PB217	water	0	No	7	0	0	h
Fig. 42	Yes	GT1	water	0	No	7	0	0	h
Fig. 43	Yes	IRCA631	CCP	5	Yes	4	79,6	2,5	a
Fig. 43	yes	PB217	CCP	5	Yes	4	73,3	3,3	a
Fig. 43	yes	GT1	CCP	5	Yes	4	14,6	1	bc
Fig. 43	yes	IRCA631	<i>ccpΔcasI</i>	5	Yes	4	20,5	1,8	b
Fig. 43	Yes	PB217	<i>ccpΔcasI</i>	5	Yes	4	13,3	1	bc
Fig. 43	yes	GT1	<i>ccpΔcasI</i>	5	Yes	4	11,6	0,7	c
Fig. 43	yes	IRCA631	water	0	Yes	4	0	0	e
Fig. 43	yes	PB217	water	0	Yes	4	0	0	e
Fig. 43	yes	GT1	water	0	Yes	4	0	0	e
Fig. 43	Yes	IRCA631	CCP	5	No	4	24,6	2	b
Fig. 43	Yes	PB217	CCP	5	No	4	15	1,2	bc
Fig. 43	Yes	GT1	CCP	5	No	4	0	0	e
Fig. 43	yes	IRCA631	<i>ccpΔcasI</i>	5	No	4	0,4	0,1	d
Fig. 43	Yes	PB217	<i>ccpΔcasI</i>	5	No	4	0,5	0,1	d
Fig. 43	Yes	GT1	<i>ccpΔcasI</i>	5	No	4	0	0	e
Fig. 43	Yes	IRCA631	water	0	No	4	0	0	e
Fig. 43	Yes	PB217	water	0	No	4	0	0	e
Fig. 43	yes	GT1	water	0	No	4	0	0	e
Fig. 44	No	IRCA631	CCP	10	No	9	75,5	7	a
Fig. 44	No	PB260	CCP	10	No	9	31,5	4	b
Fig. 44	No	RRIM600	CCP	10	No	9	0,8	0,2	c

Fig. 44	No	GT1	CCP	10	No	9	2,1	0,6	c
Fig. 44	No	IRCA631	<i>ccpΔcas1</i>	10	No	9	3,7	0,6	c
Fig. 44	No	PB260	<i>ccpΔcas1</i>	10	No	9	1,4	0,5	c
Fig. 44	No	RRIM600	<i>ccpΔcas1</i>	10	No	9	0	0	c
Fig. 44	No	GT1	<i>ccpΔcas1</i>	10	No	9	0	0	c
Fig. 44	No	IRCA631	water	0	No	9	0	0	c
Fig. 44	No	PB260	water	0	No	9	0	0	c
Fig. 44	No	RRIM600	water	0	No	9	0	0	c
Fig. 44	No	GT1	water	0	No	9	0	0	c

¹Concentration of the inoculated conidial suspension, in conidia/μl

²Gentle pinpoint scraping of leaflet abaxial epidermis before application of the treatment

³Days post inoculation

⁴Mean of necrosis surface, in mm²

⁵Standard error

⁶Different letters indicate significant differences according to Tuckey's HSD test (Figures 41 and 44) or Kruskal test (Figures 42 and 43, $\alpha = 0.05$)

Annexe 6 – Results of variance analysis of the %EL response of 18 clones to 24 treatments

	df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr (>F)	R ²
Treatment	5	60928	12186	181.5	<2e-16***	34
Clone	17	54072	3181	47.4	<2e-16***	30
Treatment x Clone	85	42628	502	7.5	<2e-16***	24
Residuals	324	21757	67			12

df: degrees of freedom

Sum Sq: Sum of Squares

Mean Sq: Mean Squares

F (Fisher) Value is the ratio of the Model Mean Square to the Error Mean Square

Pr (>F): Significance levels '***' 0.001, '**' 0.01, '*' 0.05, '.' 0.1

R² (%): Contribution to the total change calculated by Sum Sq on total Sum Sq

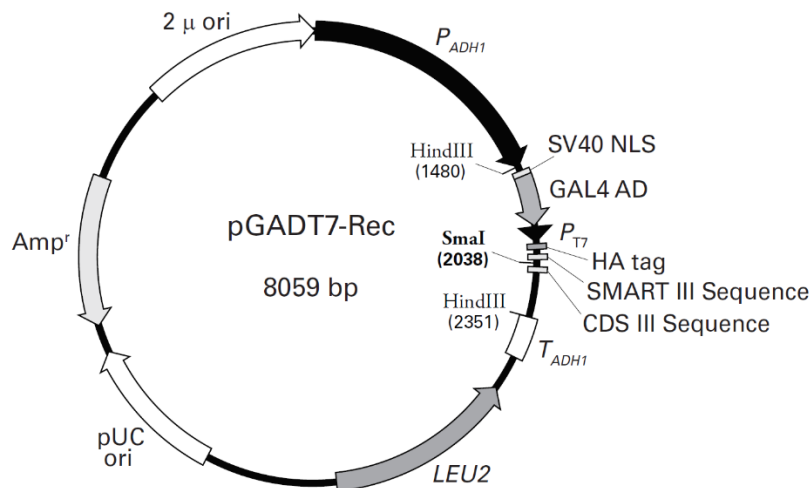
Annexe 7 – Data and statistical significance of Figure 45 (Chapitre 2)

	Clusters	Means	Statistical significance (SNK test, $\alpha = 0.05$)
Treatment	Tr1	57.35	a
	Tr2	54.00	ab
	Tr3	49.50	b
	Tr4	39.56	c
	Tr5	35.29	c
	Tr6	25.36	d
Clone	CL1	59.65	a
	CL2	43.49	b
	CL3	32.20	c

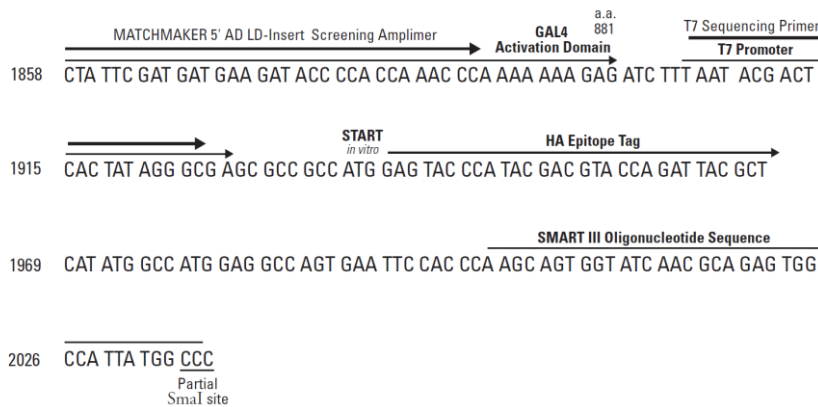
Annexe 8 – Composition et rôle des milieux de culture de levures

Nom du milieu	Composants	Souches sélectionnées
Milieux de culture de maintien, non sélectif		
0.5X YPDA	25 g/l YPD Broth ; 40 mg/l Hemisulfate d'adénine ; pH6 ; 20 g/l Agar	Y187 et Y2HGold
1X YPDA	50 g/l YPD Broth ; 80 mg/l Hemisulfate d'adénine ; pH6 ; 20 g/l Agar	
2X YPDA	100 g/l YPD Broth ; 160 mg/l Hemisulfate d'adénine ; pH6 ; 20 g/l Agar	
Milieux de culture de maintien, sélectifs		
SD/-Trp	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 1,55 g/l Drop out without Tryptophane ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml)	Y2HGold
SD/-Leu	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 1,6 g/l Drop out without Leucine ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml)	Y187
Milieux de culture pour tests d'auto-activation et de toxicité		
SD/-Trp/X-α-Gal	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 1,55 g/l Drop out without Tryptophane ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml) ; 40 μ g/ml X- α -Gal	Y2HGold
SD/-Trp/ X-α-Gal/Aba	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 1,55 g/l Drop out without Tryptophane ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml) ; 40 μ g/ml X- α -Gal ; 125 μ g/ml Auréobasidine (Aba)	Y2HGold
Milieux de culture sélectifs		
SD/-Trp/-Leu (DDO)	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 1,55 g/l Drop out without Leucine and Tryptophane ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml)	Cellules de levures diploïdes
SD/-Trp/-Leu/X-α-Gal/Aba (DDO/X/A)	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 1,55 g/l Drop out without Leucine and Tryptophane ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml) ; 40 μ g/ml X- α -Gal ; 125 μ g/ml Auréobasidine (Aba)	Cellules de levures diploïdes présentant une interaction physique plus ou moins forte entre les protéines recombinantes proies et appâts
SD/-Trp/-Leu/-Adé/-His/X-α-Gal/Aba (QDO/X/A)	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 0,6 g/l Drop out without Leucine, Tryptophane, Histidine et Adénine ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml) ; 40 μ g/ml X- α -Gal ; 125 μ g/ml Auréobasidine (Aba)	
SD/-Trp/-Leu/-Adé/-His/X-α-Gal/Aba + 3-AT (QDO/X/A + 3-AT)	1,7g/l YNB ; 5 g/l Sulfate d'ammonium ; 0,6 g/l Drop out without Leucine, Tryptophane, Histidine et Adénine ; pH5.9 ; 20 g/l Agar ; glucose 50% (20 ml pour 500 ml) ; 40 μ g/ml X- α -Gal ; 125 μ g/ml Auréobasidine (Aba) ; 84 mg/ml 3-amino triazol (1 mM final)	

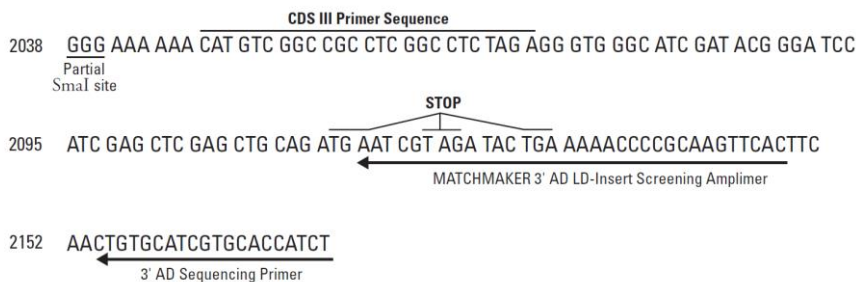
Annexe 9 – Carte du plasmide pGADT7-Rec



SMART™ III terminus



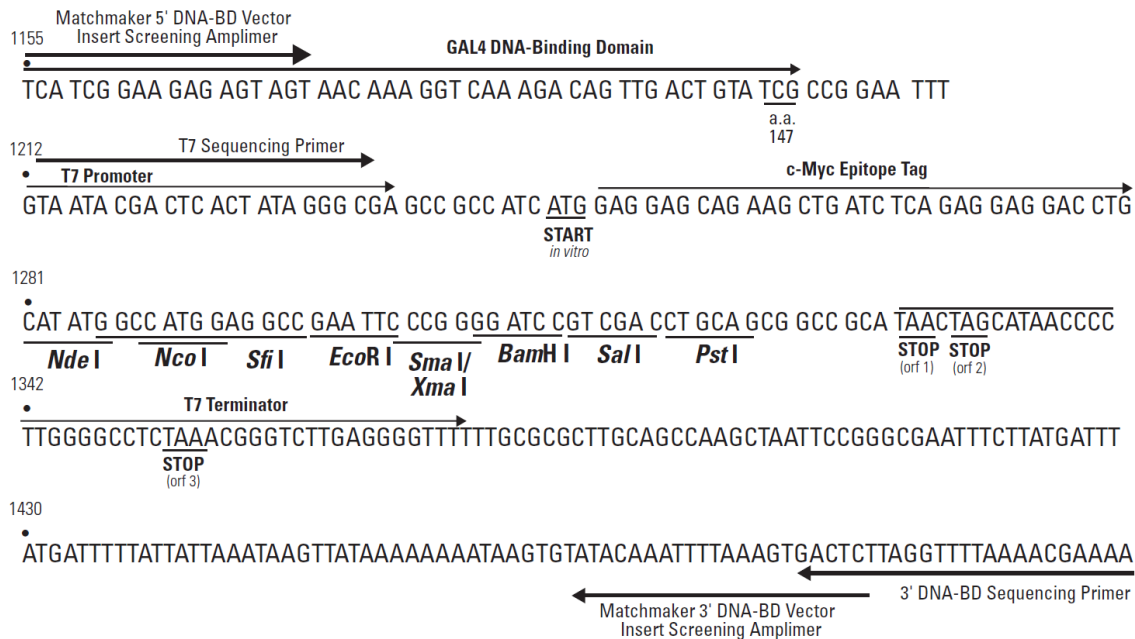
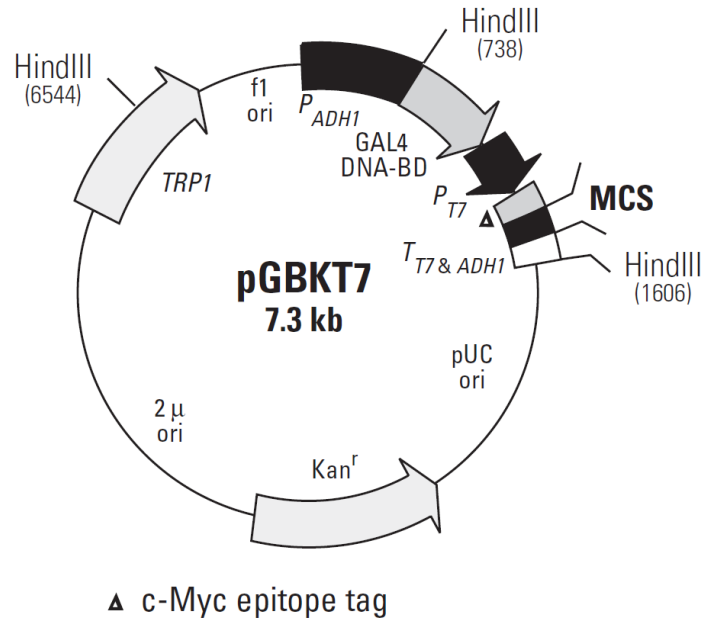
CDS III terminus



Le plasmide pGADT7-Rec exprime une protéine proie d'intérêt fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4 (GAL4 AD). La transcription commence au niveau du promoteur constitutif ADH1 (P_{ADH1}) et se termine avec le signal de terminaison ADH1 (T_{ADH1}). La séquence GAL4 AD comprend un signal de localisation nucléaire SV40 (SV40 NLS) permettant de cibler la protéine fusion vers le noyau. L'étiquette de l'hémagglutinine (HA tag) sert à l'identification par un anticorps polyclonal de chez Clontech. Le promoteur T7 (P_{T7}) permet la transcription et la traduction *in vitro* de la protéine de fusion marquée par l'étiquette HA. Il fournit également un site de liaison pour l'amorce de séquençage T7.

Dans sa forme circulaire, pGADT7-Rec se réplique de manière autonome dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae* à partir des origines de réplique pUC et 2 μ , respectivement. Le vecteur porte un gène conférant la résistance à l'ampicilline (Amp^r) permettant la sélection chez *E. coli* et un marqueur nutritionnel de la synthèse de leucine (LEU2) permettant la sélection chez *S. cerevisiae*.

Annexe 10 – Carte du plasmide pGBKT7



Le plasmide pGBKT7 exprime une protéine appât d'intérêt fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (GAL4 DNA-BD). La protéine fusion est fortement exprimée grâce au promoteur constitutif ADH1 (P_{ADH1}) ; la transcription est terminée par les signaux de terminaison de la transcription T7 et ADH1 ($T_{T7 \& ADH1}$). Le plasmide contient un promoteur T7, une étiquette c-Myc et un site de clonage multiple (MCS). Il se réplique de manière autonome dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae* à partir des origines de répllication pUC et 2 μ , respectivement. Le vecteur porte un gène conférant la résistance à la kanamycine (Kan^r) permettant la sélection chez *E. coli* et un marqueur nutritionnel de la synthèse du tryptophane (TRP1) permettant la sélection chez *S. cerevisiae*.

RÉSUMÉ

L'hévéa (*Hevea brasiliensis*) est la seule source de caoutchouc naturel commercialisé à travers le monde. En Afrique et en Asie, la maladie 'Corynespora Leaf Fall' (CLF), causée par le champignon nécrotrophe *Corynespora cassiicola*, affecte les plantations hévéicoles en provoquant des défoliations massives sur les clones les plus sensibles. L'évaluation précoce de la sensibilité des clones dans les programmes de sélection est un enjeu majeur pour écarter les individus les plus sensibles des programmes de développement et ainsi réduire la pression de la maladie. Une des méthodes d'évaluation envisagée consiste à tester indirectement la sensibilité des clones aux effecteurs fongiques responsables de la virulence (**test toxinique**). Parmi tous les effecteurs potentiels du champignon identifiés *in silico*, seule la **cassiicoline Cas1** a été purifiée et caractérisée à ce jour. Il s'agit d'une petite glycoprotéine sécrétée qui jouerait un rôle dans les phases précoces de l'infection en induisant la nécrose des tissus. Les souches porteuses du gène *Cas1* sont parmi les plus agressives sur les clones d'hévéa testés. Néanmoins, certaines souches de *C. cassiicola* ne produisant pas de cassiicoline présentent tout de même une agressivité modérée, suggérant l'implication d'autres effecteurs dans l'établissement de la maladie CLF.

Les **objectifs** de cette thèse sont (i) de déterminer si la sensibilité à la cassiicoline Cas1 est un critère de sélection pertinent pour identifier les clones d'hévéa les plus sensibles à la maladie CLF, et (ii) d'identifier chez l'hévéa des facteurs de sensibilité à la cassiicoline Cas1.

Nous avons d'abord analysé l'inoculum naturel et montré que les souches porteuses du gène *Cas1* représentent un quart de la population de *C. cassiicola* dans les plantations d'hévéa d'Afrique de l'Ouest, le reste étant majoritairement constitué de souches dépourvues du gène codant la cassiicoline (Type A/Cas0). Nous avons ensuite créé un mutant de délétion du gène *Cas1* pour la souche de référence CCP et comparé sa virulence à celle de la souche sauvage. Nous avons ainsi pu montrer que la cassiicoline Cas1 est bien un effecteur de nécrotrophie déterminant pour la virulence de *C. cassiicola* chez l'hévéa puisque la souche délétée perd toute virulence sur les clones testés. Enfin, nous avons recherché chez l'hévéa des facteurs de sensibilité à la cassiicoline Cas1 à travers deux approches. La technique de "double hybride en levures" nous a permis d'identifier une trentaine de protéines candidates qui pourraient interagir physiquement avec la toxine. Une approche transcriptomique, nous a permis d'identifier les gènes d'hévéa dont l'expression est modifiée suite à l'application de la cassiicoline purifiée, en comparant un clone sensible (PB260) et un clone tolérant (RRIM600).

En **conclusion**, ces travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction compatible entre *C. cassiicola* et l'hévéa et ouvrent la voie de la **sélection assistée par effecteur**.

Mots clés : *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, CLF, cassiicoline, effecteur, test toxinique, diversité, mutant de délétion, facteurs de sensibilité.