



Rapport de la conférence Fungal Genetics à Pacific Grove (Californie), le 14-19 mars 2017

par Julie Gervais⁽¹⁾ et Yohann Petit⁽¹⁾

⁽¹⁾ UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Avenue Lucien Brétignières, BP 01, Thiverval-Grignon, F-78850, France

Je m'appelle Julie Gervais et je suis étudiante en troisième année de thèse à l'UMR INRA AgroParisTech BIOGER. Dans le cadre de ma thèse je m'intéresse au champignon, *Leptosphaeria maculans*, responsable de la maladie de la nécrose du collet sur colza. Je cherche à mieux caractériser la colonisation de la tige de colza par le champignon engendrant la nécrose du collet, et ce notamment par des approches transcriptomiques.

Je suis Yohann Petit, doctorant en troisième année de thèse dans l'équipe *Effecteurs et Pathogénie de Leptosphaeria maculans* de l'UMR INRA/AgroParisTech BIOGER. Au cours de ma thèse j'ai cherché à déterminer le mode d'action d'effecteurs de *L. maculans* afin de mieux comprendre leur implication dans le pouvoir pathogène et le processus infectieux.

La bourse Jean & Marie-Louise Dufrenoy que nous avons obtenue nous a permis d'assister à la 29^{ème} édition de la conférence Fungal Genetics qui s'est déroulée aux Etats-Unis, entre le 14 et 19 mars 2017. Ce congrès international a regroupé 918 scientifiques et permis de partager les différentes avancées et découvertes sur la génétique fongique. Dans ce compte-rendu nous rapportons les faits marquants des meetings satellites au congrès, portant sur les rouilles fongiques et sur les Dothidéomycètes, puis ceux des sessions plénières et des sessions concurrentes "Interactions Plantes-Champignon" et "Effecteurs et Petites Protéines Sécrétées riches en cystéines".

1. Meeting Satellite: les rouilles fongiques

Le premier *workshop* « Rouilles Fongiques » s'est tenu parmi les séminaires satellites de la 29^{ème} édition du congrès de génétique fongique. Cet atelier était organisé en deux parties. Premièrement les orateurs invités et/ou dont les résumés ont été sélectionnés par les

organisateurs, ont présentés leurs derniers travaux. Puis des tables rondes étaient organisées autour des deux problématiques bien connues de la communauté des rouilles fongiques (i) « **Technologies : the good, the bad and the plain ugly** » faisant référence aux difficultés techniques auxquelles fait face la communauté pour étudier la biologie rouilles fongiques au niveau moléculaire et (ii) « **Building community resources for genomics** » abordant notamment la mise à disposition des données génomiques acquises pour la communauté scientifiques des rouilles.

Parmi les travaux présentés au cours de ce *workshop*, deux présentations avaient pour objet l'analyse de l'expression des gènes de rouilles fongiques au cours de leur cycle de vie. **Philippe Tanguay** (Centre de Foresterie des Laurentides, Canada) menant ses travaux sur *Cronartium ribicola* responsable de la rouille du pin blanc et **Sébastien Duplessis** (Centre INRA Grand Est Nancy, France) travaillant sur l'agent de la rouille du peuplier *Melampsora larici-populina* ont présentés deux champignons hétéroïques (alternant sur deux hôtes) et macrocycliques (cinq types de spores différents). *M. larici-populina* effectue sa reproduction sexuée sur mélèze (*Larix* spp) et son cycle végétatif sur peuplier (*Populus* spp) tandis que *C. ribicola* alterne entre *Ribes* spp et *Pinaceae* spp. En utilisant une approche transcriptomique de séquençage d'ARN à différents stades des cycles de vie de ces deux rouilles capables d'infecter des hôtes très différents, ils ont pu mettre en évidence des répertoires de gènes exprimés spécifiquement aux stades d'infection de l'hôte écidien versus des gènes exprimés préférentiellement aux stades d'infection de l'hôte télien. Les approches globales présentées par Philippe Tanguay et Sébastien Duplessis apportent de nouvelles connaissances sur les gènes spécifiquement exprimés lors de l'alternance entre deux hôtes phylogénétiquement éloignés.

L'alternance d'hôte chez les rouilles fongiques (Pucciniales) soulève des questions quant à l'évolution de ces champignons vers des cycles de vie complexes. L'intervention de **Catherine Aime** (*Purdue University*, Etats-Unis) était centrée sur la phylogénétique des rouilles fongiques pour donner une perspective systématique sur l'évolution de ce groupe d'agents phytopathogènes. Catherine Aime nous a d'abords rappelé que le groupe des Pucciniales représente à ce jour le plus large groupe connu, exclusivement composé d'agents phytopathogènes (au moins 7800 espèces décrites). Les Pucciniales sont tous des biotrophes obligatoires avec de gros génomes et dont la beaucoup d'espèces sont hétéroïques et/ou macrocycliques. Mais certaines rouilles fongiques ont des cycles réduits à un seul hôte comme c'est le cas pour *Melampsora lini*, agent de la rouille du lin. Deux hypothèses se confrontent pour comprendre l'hétéroïsmie des rouilles fongiques : (i) l'hétéroïsmie est un caractère ancestral : les hôtes « primitifs » arborent des rouilles fongiques « primitives » et (ii)

l'hétéroïsme est un caractère dérivé : les Pucciniales hétéroïques ont évolué à partir de rouilles fongiques tropicales « à cycles courts ». Cependant la première hypothèse se trouve infirmée par l'exemple de deux rouilles fongiques infectant des fougères *Hyalospora polypodii* et *Uredinopsis intermedia* qui n'occupent pas une place basale dans l'arbre phylogénétique basé sur l'analyse de l'ADN ribosomal 18S des Pucciniales. Ainsi ces deux rouilles fongiques de fougères ne sont pas primitives. Par ailleurs, les rouilles fongiques classées à la base de l'arbre phylogénétique (basé sur l'analyse de l'ADNr 28S) peuvent être soit hétéroïques/macrocycliques (*Mikronegeria spp*), soit les stades écidien ou télien sont inconnus et ont probablement disparus (*Hemileia spp* et *Caeoma spp* respectivement). Ainsi, l'évolution des rouilles fongiques reste encore peu connue. La fertilisation des spermogonies est contrainte par le temps et dans l'espace nécessitant la conservation de l'hôte écidien. Le brassage génétique de la reproduction sexuée apporte un nouveau potentiel génétique pour infecter un autre hôte télien ce qui complexifie la phylogénie liée à l'hôte télien. Enfin, la multiplication végétative des urédiniospores renforce l'infection de l'hôte télien, faisant des rouilles fongique un groupe d'agents phytopathogènes peu ordinaire et particulièrement adapté.

Quatre présentations sur sept avaient pour objet la caractérisation fonctionnelle d'effecteurs candidats de différentes rouilles fongiques. Les effecteurs sont molécules sécrétées par les organismes associés aux plantes qui interfèrent avec la physiologie et l'immunité de l'hôte et permettent le succès de l'infection. **Steeve Whithman** (*Iowa State University*, Etats-Unis) a présenté la première étude effectoremique (identification à haut débit d'effecteurs candidats) réalisée sur l'agent de la rouille du soja *Phakopsora pachirizi*. Steeves Whithman et son équipe ont criblé les capacités de 82 effecteurs candidats à supprimer et/ou activer les réponses immunitaires en système hétérologue (plantes modèles) et chez le soja. La combinaison de ces différents tests avec une approche de localisation subcellulaire, a permis de mettre en évidence PpEC15. PpEC15 est un effecteur candidat qui présente une activité protéase qui diminue les défenses basales chez le tabac et *Arabidopsis thaliana* (systèmes hétérologues). **Cécile Lorrain** (Centre INRA Grand Est Nancy, France) a pour sa part eu l'opportunité de présenter ses travaux de thèse portant sur l'analyse structurale et fonctionnelle de deux effecteurs candidats de l'agent de la rouille foliaire du peuplier, *Melampsora larici-populina*. L'un de ces candidats en particulier, nommé MlpCTP1 (« *Chloroplast Targeted Protein 1* »), porte un peptide d'adressage nécessaire et suffisant à la translocation de la GFP dans les chloroplastes. MlpCTP1 fait partie d'une famille d'effecteurs candidats spécifique des Melampsoraceae dont deux membres sont également adressés aux chloroplastes. Des hybrides *Populus tremula* x *P. alba* 717-1B4 exprimant CTP1 couplé à un marqueur fluorescent ont été produits permettant la confirmation de la localisation chloroplastique dans

un *Populus*. Le deuxième effecteur candidat appelé Mlp124017 interagit avec une *TOPLESS-related protein 4* de peuplier. Les protéines *TOPLESS* et *TOPLESS-related* sont des répresseurs de transcription impliqués dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires dont la régulation de la voie de l'acide jasmonique (rôle dans l'immunité). D'autre part, la production de protéines recombinantes de MLP124017 en système bactérien (*Escherichia coli*) a permis de conduire une analyse de la structure tridimensionnelle par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). MLP124017 montre une homologie de structure avec deux protéines bactériennes décrites comme « *Nuclear-Transport Factor 2-like proteins* » (*NTF2-like*).

Roshan Poudel (North Dakota State University, Etats-Unis) a également présenté ses travaux de l'identification et de caractérisation fonctionnelle d'un effecteur candidat de *Puccinia graminis f. sp. tritici* agent de la rouille noire du blé et de l'orge. Le locus de résistance rpg4/rpg5 confère à l'orge une résistance contre beaucoup d'isolats de *P. graminis*. Pour identifier le locus d'avirulence et/ou l'effecteur Arv4/5 correspondant chez *P. graminis*, Roshan Poudel a utilisé une approche de RAD-genotyping (« *Restriction Site Associated DNA-genotyping* ») sur 37 isolats, couplée à une approche de RNAseq sur 24 isolat. Ainsi 11 effecteurs candidats ont été identifiés avec une expression différentielle selon le génotype et montrant une ségrégation avrrpg4/5 et AvrRpg4/5 chez les isolats correspondants.

Chun Lie Tang a présenté les travaux menés dans son groupe à Northwest A&F University (Chine) sur l'identification d'un facteur de virulence MAPKK de *Puccinia striiformis f. sp. tritici* agent de la rouille du blé. Pour cela, une approche d'inactivation de gènes par ARN interférents a été mise en place. Cette approche appelée « *Host-induced gene silencing* » (HIGS) pour inactivation de gènes induite par l'hôte repose sur le principe d'un échange d'ARN interférents (ARNi) entre hôte et parasite. Chung Lie Tang et ses collègues ont identifié que l'inactivation d'une MAPK kinase PsFUZ7 chez *P. striiformis* provoque une perte de la virulence. *P. striiformis* est incapable de se développer et d'infecter les lignées de blé transgéniques stables ARNi PsFUZ7. De plus les niveaux d'expression des gènes de *P. striiformis* impliqués dans la voie de signalisation des MAPK kinases sont fortement diminués tandis que les réactions de défenses du parasite sont activées. Ces résultats montrent comment l'approche HIGS est un outil efficace pour identifier et cibler les mécanismes moléculaires importants des rouilles fongiques dont la transformation stable reste impossible.

2. Meeting Satellite : la génomique comparative des Dothidéomycètes

Aujourd'hui séquencer les génomes des espèces étudiées est devenu indispensable pour comprendre et étudier en profondeur comment fonctionnent, évoluent les espèces.

Cenococcum geophilum est le seul Dothidéomycète capable de faire des mycorhizes. En association avec de très nombreuses espèces d'arbres, il permet d'augmenter la résistance au stress hydrique de ces hôtes. **Annegret Kohler** (Centre INRA Grand Est Nancy, France) et son équipe ont réalisé le séquençage du génome de *C. geophilum* et ont constaté que son génome avait une taille beaucoup plus importante que celles des autres Dothidéomycètes connus. Son génome fait 160 Mb avec 81% de séquences répétées. Il présente des marques indiquant la présence de RIP (Repeat Induced Point mutation) et semble être à "deux-vitesses". Parmi les gènes présents, l'équipe d'Annegret Kohler a identifié à grand nombre de gènes codants pour des enzymes de dégradation des parois, des gènes du métabolisme secondaire.

Stefania Bertazzoni (Curtin University, Australia) et son équipe ont réalisé le reséquençage *Parastagonospora nodorum* en utilisant la technologie PacBio associé à de la carte optique. L'assemblage et l'annotation du génome ont ainsi pu être améliorés, en y associant de nouvelles données RNA-seq obtenues *in vitro* et *in planta*. En comparant le nouveau génome obtenu avec celui d'autres isolats de *P. nodorum* et de l'espèce proche *P. avenaria*, Stefania Bertazzoni a observé qu'il existait une variabilité en termes de nombre de chromosomes. *P. nodorum* aurait des chromosomes dispensables qui seraient potentiellement issus d'une cassure au niveau des télomères d'autres chromosomes.

Thierry Rouxel (INRA, France) et son équipe ont présenté une mise à jour du génome du champignon *Leptosphaeria maculans*, agent pathogène du colza. Avec des approches combinées de séquençage Nanopore, carte optique et données transcriptomiques obtenues sur l'ensemble du cycle infectieux, ils ont pu apporter une nette amélioration à la fois à l'assemblage mais aussi de l'annotation du génome. Ce génome sera prochainement mis à disposition à l'ensemble de la communauté.

Toujours sur le modèle de *L. maculans*, j'ai (**Julie Gervais**, INRA, France) présenté son travail portant sur la colonisation systémique du colza par le champignon, un stade infectieux encore très mal compris. Par des approches transcriptomiques, les gènes du champignon spécifiquement exprimés à ce stade ont pu être identifiés, notamment des effecteurs candidats. Julie Gervais a constaté que les effecteurs exprimés lors de la colonisation systémique, dits tardifs, n'avaient pas du tout la même localisation que les effecteurs impliqués dans la colonisation des cotylédons, dits précoces: Les effecteurs précoces sont localisés dans des régions génomiques pauvres en gène alors que les effecteurs tardifs sont localisés dans des régions génomiques riches en gènes. Elle a également réalisé la validation fonctionnelle d'un effecteur tardif, LmSTEE1, qui serait impliqué dans le développement de la nécrose dans la tige.

J'ai (**Yohann Petit**, INRA, France) pour ma part présenté des travaux portant sur deux gènes d'avirulence de *L. maculans* impliqués dans une interaction gène-pour-gène inhabituelle avec le gène de résistance correspondant. AvrLm10-1 et AvrLm10-2, deux potentiels gènes d'avirulence localisés en orientation inverse dans une région riche en éléments répétés, sont tous deux indispensables pour être reconnus par le gène de résistance Rlm10 de la moutarde noire. La complémentation de *L. maculans* avec un seul de ces gènes n'est pas suffisante pour déclencher cette reconnaissance, et l'inactivation d'un seul des deux est suffisante pour y échapper. De manière encore plus intéressante, des homologues protéiques de ces protéines d'avirulence sont présents chez plusieurs espèces de *Colletotrichum* et deux Dothideomycètes, ce qui est plutôt inhabituel pour les protéines d'avirulence de *L. maculans*. De plus, à chaque fois le gène codant pour l'homologue d'AvrLm10-1 est située en orientation inverse avec le gène codant pour l'homologue d'AvrLm10-2. Cette conservation de syntenie, discontinue puisqu'elle est observée chez quelques Dothideomycètes et Sordariomycètes, pose des questions quant à son rôle dans la pathogénie de *L. maculans*, et peut-être des autres champignons dans lesquels on la retrouve.

L. maculans est donc un bon modèle fongique pour étudier les interactions plante-phytopathogènes aux échelles génomique, génétique et moléculaire. Cependant, contrairement à d'autres modèles, il n'est pas possible d'inactiver des gènes localisés en isochores AT par recombinaison homologue. L'inactivation de gènes de *L. maculans* se fait donc uniquement par « *silencing* ». C'est pourquoi **Alexander Idnurn** (University of Melbourne, Australia) a essayé de mettre au point l'outil d'édition de génome CRISPR/Cas9 pour inactiver des gènes de *L. maculans*. Le système CRISPR/Cas9 a récemment été appliqué à quasiment tous les modèles d'études en biologie, y compris l'humain. Le système a été optimisé pour les champignons filamenteux chez *Aspergillus nidulans*, pour lequel beaucoup de mutants de délétion sont déjà disponibles. Pour *L. maculans*, le gène choisi pour initier ces tests a été *hos1*. Des souches naturelles possédant des mutations dans ce gène sont naturellement résistantes à l'iprodione, un fongicide utilisé principalement en Australie pour lutter contre le phoma du colza. La délétion ciblée de *hos 1* au moyen du système CRISPR/Cas9 permet au mutant d'être complètement résistant à l'iprodione. Cet outil a également été testé sur 2 gènes d'avirulence (AvrLm1 et AvrLm4-7), un facteur de transcription, un gène de biosynthèse de l'acide abscissique et le gène *ligD* impliqué dans le système de réparation des cassures double-brin par recombinaison non-homologue (Non-Homologous End-Joining : NHEJ). L'inactivation d'un composant du NHEJ pourrait même être encourageante pour mettre au point un système de délétion de gènes par recombinaison homologue.

Zhaohui Liu (North Dakota State University, USA) a également mis au point un outil de biotechnologie pour mieux décrire le pathosystème *Pyrenophora tritici-repentis*-blé. Selon les canons du modèle gène-pour-gène de Flor (1942), dans le contexte d'une interaction plante-pathogène, à chaque gène de résistance de la plante hôte va correspondre un gène d'avirulence de l'agent pathogène. L'interaction sera incompatible lorsque l'allèle dominant du gène de résistance reconnaîtra le gène d'avirulence correspondant, et compatible dans tous les autres cas. Cependant, dans le cadre d'une interaction avec un agent pathogène nécrotrophe, un autre modèle peut être mis en jeu. En effet, l'infection par des champignons tels que *P. tritici-repentis* passe par des gènes de sensibilité dominant de la plante : dans ce modèle gène-pour-gène inverse, l'infection aura lieu lorsqu'un gène codant pour un effecteur nécrotique reconnaîtra un gène de sensibilité dominant de la plante. Par exemple lorsque ToxA reconnaîtra Tsn1, ou ToxB Tsc2, ou encore ToxC Tsc1. D'autres gènes codant des effecteurs nécrotiques existent certainement car des souches Δ tsn1 sont toujours sensibles à des souches de race 2 (ne possédant pas ToxA). D'autres facteurs de virulence existent donc probablement chez *P. tritici-repentis*, mais le mode de reproduction homothalique de ce champignon empêche de faire des croisements pour les trouver. C'est pourquoi les auteurs ont essayé de convertir chez *P. tritici-repentis* à l'hétérothalisme en inactivant les gènes mat1 et mat2 responsable du type sexuel du champignon. Les mutants obtenus sont stériles, mais un croisement d'un mutant Δ mat1 ou Δ mat2 par une souche sauvage permet de restaurer une fertilité partielle. Il sera donc possible de générer des descendants ségrégeant pour les gènes Tox et de les tester sur différentes variétés de blé afin de trouver d'autres facteurs de virulence.

Parmi les pathosystèmes les plus importants économiquement présentés lors de ce meeting satellite figure l'interaction entre *Zymoseptoria tritici* et le blé, une des plantes les plus cultivées au niveau mondial. *Z. tritici* cause la septoriose du blé, qui cause chaque année des pertes de rendements catastrophiques et met en danger les récoltes partout dans le monde. L'utilisation de fongicides entraînant des problèmes d'ordre environnemental, et les souches de *Z. tritici* s'adaptant rapidement à ces fongicides, un grand effort est fait pour trouver des sources de résistances génétiques dans les variétés de blé. A ce jour 21 gènes de résistance majeurs et 89 QTL de résistance quantitative ont été identifiés dans le blé. Dans cette optique, **Andrea Sanchez-Vallet** (ETH, Suisse) a croisé une souche virulente sur le cultivar (?) avec une souche avirulente afin de trouver des QTL de résistance. Une approche de génétique d'association à l'échelle du génome a permis d'identifier 4 gènes codant pour des petites protéines sécrétées. L'inactivation d'un de ces gènes par recombinaison homologue rend la souche avirulente un peu plus virulente. Le gène d'avirulence potentiel a été baptisé Avr3D1, et sa reconnaissance est cultivar-spécifique. Mais le locus de résistance, présent dans

d'autres cultivars, pourrait correspondre aux gènes de résistance Stb7 ou Stb12. Avr3D1 est présent dans tous les isolats testés et présente beaucoup de polymorphisme. Cette importante conservation laisse penser que ce gène d'avirulence est important pour la fitness fongique au cours de l'infection. De plus, deux grosses insertions d'éléments transposables autour d'Avr3D1 semblent contribuer à la virulence, même en absence des gènes de résistance correspondants, ce qui appuie l'idée d'un effet fitness pour ce gène d'avirulence.

Thierry Marcel (INRA, France) a également identifié un nouveau gène d'avirulence de *Z. tritici*. Une étude de génétique d'association à l'échelle du génome a été effectuée pour trouver de nouveaux gènes de pathogénie sur un échantillonnage de 2236 isolats collectés en France. Cette étude a permis d'identifier le gène d'avirulence AvrStb6, reconnu par Stb6. Il avait été démontré en 2000 que l'interaction génétique entre AvrStb6 et St6, le seul couple de gènes d'avirulence/résistance connu chez *Z. tritici*, était contrôlé par un seul gène. Mais ces nouveaux travaux constituent le premier exemple d'identification précise et de validation d'un gène d'avirulence de *Z. tritici* et devraient permettre d'accélérer la caractérisation des interactions génétiques entre *Z. tritici* et le blé.

Le génome de *Z. tritici* est constitué de chromosomes indispensables et de chromosomes accessoires. **Mareike Möller** (*Christian-Albrechts University of Kiel, Germany*) s'est posé la question de la stabilité de ces chromosomes accessoires durant la mitose et des conséquences en cas de perte. Une expérience d'évolution à court terme (8 générations sur 4 semaines de culture) chez *Z. tritici*, mais également *Z. ardabiliae*. Il apparaît que les souches ayant perdu leur chromosomes accessoires ne présentent pas de différence de fitness in vitro, mais produisent plus de pycnides et disposent d'un avantage en terme de fitness in planta.

Zymospetoria n'infecte pas seulement le blé, mais également plusieurs herbes sauvages de l'ordre des Triticales. **Janine Haueisen** (*Christian-Albrechts University of Kiel, Germany*) a cherché des déterminants génétiques permettant d'expliquer pourquoi certaines espèces de *Zymospetoria* sont capables d'infecter le blé et pas d'autres. Elle a pour cela étudié deux espèces non-pathogène du blé mais pathogènes d'herbes sauvages, *Z. ardabiliae* et *Z. pseudotritici*. L'infection du blé par *Z. tritici* passe par quatre étapes principales : colonisation, biotrophie, transition vers la nécrotrophie et reproduction. C'est un agent pathogène strictement apoplastique qui pénètre par les stomates et colonise la cavité sous-stomatale, mais ne pénètre jamais dans les cellules végétales. Il apparaît que dans le cadre d'une infection de blé par *Z. ardabiliae* ou *Z. pseudotritici*, un langage important de d'espèces réactives à l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) stoppe la progression du champignon après la pénétration par les stomates. Une étude de transcriptomique comparative a permis de mettre en évidence 12 gènes codant des effecteurs putatifs très surexprimé durant la colonisation, dont deux sont très peu exprimés chez *Z. tritici* dans les mêmes conditions. Ces deux gènes

pourraient être des gènes d'avirulence de *Z. ardabiliae* et *Z. pseudotritici* reconnu par le blé et empêchant l'infection du blé.

3. Faits marquants des sessions plénières :

Les quatre sessions plénières représentaient l'opportunité pour chacun d'élargir sa culture scientifique dans le domaine de la génétique des champignons. Nous avons choisis de mettre en lumière une présentation pour chaque session plénière.

La première session plénière fut dédiée aux « **Model fungi : biological insights beyond the kingdom** » rappelant le rôle de l'étude des modèles fongiques dans l'acquisition de savoirs en Biologie. Paradoxalement, les oomycète *Phytophthora* spp. représentent les modèles les plus étudiés dans le domaine des interactions moléculaires plantes/organismes associés aux plantes. Les *Phytophthora* spp. font partie des agents pathogènes les plus dévastateurs dont le plus connu est *Phytophthora infestans* l'agent du mildiou de la pomme de terre, responsable de la Grande Famine d'Irlande au XIX^e siècle. **Wendo Ma** de l'université de Californie (Etats-Unis) a présenté comment des effecteurs de *P. sojae* un agent phytopathogène du soja, promeuvent l'infection en supprimant les petits ARN interférents de l'hôte. Les agents pathogènes filamenteux possèdent des centaines d'effecteurs candidats prédits par des approches de génomiques, notamment les fameux effecteurs contenant le motif RxLR. Les cibles de ces effecteurs sont très diverses. Les auteurs ont identifié des effecteurs RxRL de *P. sojae* capables de supprimer l'activité des ARN interférents du soja. L'un d'entre eux renommé PSR2 pour « *Phytophthora suppressor of RNA silencing* » dont la structure tridimensionnelle a été résolue par cristallographie, possède une structure conservée chez cinq espèces de *Phytophthora* représentant entre 20 et 30 protéines *PSR2-like*. Les auteurs ont également mis en évidence que PSR2 affecte l'accumulation de petit ARN interférents appelés phasiARN en perturbant leur voie de biosynthèse par l'interaction avec la protéine « *Double-stranded RNA-binding protein 4* » (DRB4).

La deuxième session plénière avait pour thème « **Applied Mycology : Superpowers of fungal heroes and villains** ». **Bettina Tudzynski** (*Muenster University*, Allemagne) et son équipe étudient le champignon *Fusarium fujikuroi* responsable de la maladie de Bakanae sur le riz. Dans le génome de ce champignon, 47 clusters putatifs codant pour des métabolites secondaires (MS) ont été identifiés mais dont la moitié n'est pas exprimée en condition de laboratoire. B. Tudzynski et son équipe s'intéressent donc à la régulation de ces clusters et ont pu identifier différentes voies impliquées. Il y a les facteurs de transcription spécifiques aux clusters, souvent de la famille des Zn2-Cys6, les régulateurs globaux: AreA par exemple contrôle l'expression des clusters de la gibbérelline et du pigment rouge bikaverine. La surexpression du régulateur Sge1 conduit à une augmentation de la production de plusieurs MS. Csm1, identifié chez *Aspergillus nidulans* et *Botrytis cinerea*, est également un régulateur

global. La régulation chromatinienne joue aussi un rôle dans l'expression des MS. Les régions télomériques du génome où se trouvent des clusters de MS, sont enrichies en marques épigénétiques H3K27me3, marqueurs de régions compactées et avec peu d'expression des gènes s'y trouvant. La diminution de l'expression du gène KMT6 contrôlant ces marques H3K27me3 conduit à la surexpression de 20 des 47 clusters putatifs de MS. Il existe aussi des régulateurs négatifs dont la délétion permet l'expression de métabolites secondaires. La co-cultivation de *F. fujikuroi* avec d'autres organismes pourrait potentiellement permettre l'expression d'autres clusters de MS. Bettina Tudzynski et son équipe ont pu ainsi constater que chaque cluster était spécifiquement régulé par différents sets de régulateurs.

Le millet est résistant à *Fusarium graminearum* alors que ce dernier peut infecter des espèces proches telles que le blé et le maïs. **Manish Raizada** (*University of Guelph, Canada*) et son équipe étudient le rôle d'une bactérie endophyte des racines, *Enterobacter* M6, dans la résistance au champignon. Ils ont montré que cette bactérie inhibait la croissance de *F. graminearum* *in vitro*. En présence d'*Enterobacter* M6, l'impact du champignon sur le maïs était réduit de 70 à 90%. Pour comprendre l'implication de cette bactérie dans la résistance à *F. graminearum*, l'équipe de Manish Raizada a utilisé ~~a~~ créé des bactéries exprimant la protéine fluorescente GFP et les ont visualisées au niveau racinaire. En présence du champignon, les bactéries forment une barrière le long de la racine, limitant l'entrée du pathogène dans la plante. Ces bactéries produisent aussi de l'auxine favorisant le développement des poils racinaires. Cette association de bactéries et des poils racinaires va également bloquer le champignon, l'empêchant de progresser dans les racines, voir même en participant activement à sa destruction. Une mutagenèse aléatoire des gènes d'*Enterobacter* M6 a montré que les gènes participant à la protection contre *F. graminearum* codaient notamment pour des antibiotiques anti-fongiques, des molécules de signalisation et des composés antibactériens. Ces résultats suggèrent que le millet, *Fusarium graminearum* et *Enterobacter* M6 ont vécu en interaction depuis très longtemps et co-évolués ensemble.

Lors de la troisième session plénière, nous avons pu assister à des présentations autour du thème « **System Biology : Genes, Genomics and Genome Structure** ».

Il a déjà été démontré que le nécrotrophe polyphage *Botrytis cinerea* utilise des petits ARN interférents comme effecteur de la pathogénie. Mais le groupe de **Hailing Jin** (*University of California, Etats-Unis*) s'est demandé si la plante pouvait faire la même chose pour se défendre. Leur approche consiste à faire exprimer à *A. thaliana* des ARNi ciblant le complexe Dicer de *B. cinerea*, indispensable à la formation de ses petits ARN. Les plantes exprimant ces petits ARN BcDCL1/2 se sont révélées plus résistantes à l'infection par *Botrytis*, mais aussi *Verticillium dahliae*. De plus, la délétion des gènes de la plante impliqués dans la

synthèse des petits ARN augmente leur sensibilité à ces agents pathogènes. Ces résultats suggèrent que le système d'interférence ARN trans-règne est bidirectionnel, la plante peut également utiliser des petits ARN contre les champignons phytopathogènes. De plus, *B. cinerea* étant capable d'absorber des acides nucléiques depuis son environnement, les auteurs se sont demandé s'il n'était pas possible de lui faire absorber des ARNi ciblant le complexe Dicer. Il apparait que l'application sur les fruits ou les fleurs d'ARN simple ou double brins qui ciblent les gènes de ce complexe augmente la résistance des plantes à la pourriture grise. Cette découverte pourrait ouvrir la porte au développement d'un nouveau mode de lutte contre *B. cinerea* faisant appel aux petits ARN, bien qu'il convienne encore de déterminer si cette méthode est vraiment aussi écologique que prétendue.

4. Session concurrente "Interactions Plantes-Champignon"

La session concurrente consacrée aux *Interactions Plante-Champignon*, **Bart Thomma** dirigeant le *Laboratory of Phytopathology* à l'université de Wageningen (Pays Bas) a présenter ses travaux sur le « génome à deux vitesses » de *Verticillium dahliae* jouant un rôle dans l'émergence de facteurs de virulence potentiels. La plasticité des génomes permet l'adaptation à l'environnement ce qui est particulièrement important pour les organismes pathogènes engagés dans une « course à l'armement ». Bart Thomma et son équipe ont pu mettre en évidence le rôle moteur des transposons, ces éléments mobiles particulièrement abondants dans les génomes fongiques, dans la plasticité du génome de *V. dahliae*. Une approche de génomique comparative chez 9 espèces de *Verticillium*, des régions clade-spécifiques (LS) riches en transposon, a permis d'identifier des effecteurs de *V. dahliae*. Les facteurs de virulence ont été identifiés grâce à un crible de mutants knock-down d'effecteurs candidats présents dans les régions LS. Ainsi le locus Ave1 codant pour un facteur d'avirulence reconnu par le seul gène de résistance connu chez la tomate a été identifié. Ave1 présente une homologie de séquence avec des « *Plant Natriuretic Peptides* » (PNP) et une activité similaire induisant l'ouverture des stomates. Un autre effecteur a été identifié dans les régions LS, présent en deux copies ou totalement absent dans les génomes de *Verticillium* spp. La protéine correspondant à ce « D-effector » apporte une meilleure agressivité à *V. dahliae*.

Claviceps purpurea est un champignon biotrophe, capable de synthétiser ses propres cytokinines. Deux voies de biosynthèse ont pu être identifiées chez ce champignon, une première voie dite *de novo*, et une deuxième voie basée sur la dégradation des ARNt et dont la cytokynine est un sous-produit. **Sabine Kind** (*University of Muenster*, Allemagne) et son équipe cherchent à mieux comprendre les voies de biosynthèse des cytokinines chez *C.*

purpurea et leur rôle dans le processus infectieux. Par mutation de gènes LOG qui sont des enzymes permettant l'activation des cytokines, ils ont pu constater que ces gènes étant indispensables pour la production en cytokines. Dans une deuxième approche, ils ont induit chez *C. purpurea* la surexpression d'enzymes hétérologues dégradant les cytokines. Ces mutants dont les niveaux en cytokinines sont fortement impactés sont moins virulents. Ces résultats confirment donc que les cytokines par le champignon sont indispensables au processus infectieux.

Diane Saunders (*John Innes Centre, UK*) a présenté les travaux réalisés dans son groupe sur la « pathogénomique » de l'agent de la rouille jaune du blé *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Diane Saunders et son équipe collectent des populations de *P. striiformis* en champs et utilisent des approches de génomique des populations. Ainsi dans 4 groupes populationnels ont été identifiés dans les échantillons récoltés au Royaume-Uni dont des isolats originaires de la Nouvelle Zélande, de France et des résidents du Royaume-Uni. De plus, les groupes populationnels diffèrent au cours des saisons et sont spécifiques des variétés de blé cultivées. Ainsi cette approche représente un outil utile pour la gestion des maladies fongiques sur les cultures. Par exemple, une des préoccupations premières concernant la rouille jaune du blé est la potentielle acquisition de résistance contre le fongicide DMI (inhibiteurs de la synthèse des stérols). En effet, il suffit d'une mutation d'une des deux copies du gène Y134F et d'une surexpression de ce gène pour avoir une résistance aux fongicides DMI. Cette mutation a été identifiée récemment dans une population ce qui pourrait décroître l'efficacité du fongicide.

Les *Epichloë* sont des champignons endophytes qui vivent en symbiose avec les graminées. Dans cette interaction le champignon produit une série de métabolites secondaires et notamment de la peramine, qui agit comme un répulsif vis-à-vis des insectes. La peramine est produite par un module de deux peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) appelés PerA. Parmi les différents génotypes d'*Epichloë*, certaines souches présentent une copie de *PerA* avec une mutation: l'insertion d'un élément transposable dans la partie 3' du gène. Cet allèle tronqué, appelé *perA-2* est extrêmement répandu et avait été décrit jusqu'à ici comme non fonctionnel. **Daniel Berry** (*Massey University, Nouvelle Zélande*) et son équipe ont pu montrer que l'allèle *perA-2*, malgré la présence du transposon, est toujours fonctionnel et produit un nouveau peptide mais dont la fonction est encore inconnue.

Comme cela a été décrit plus tôt pour le pathosystème *P. tritici-repentis*- blé l'infection par le nécrotrophe *Parastagonospora nodorum*, étudié par le groupe de **Peter Salomon** (*The Australian National University, Australie*), passe par des gènes de sensibilité dominante de la plante : dans ce modèle gène-pour-gène inverse, l'infection aura lieu lorsqu'un gène codant pour un effecteur nécrotique reconnaît un gène de sensibilité dominante de la plante. Tox3

est un de ces effecteurs nécrotiques, une petite protéine sécrétée de 18 kDa contenant 3 cystéines et ne possédant pas d'homologues dans les bases de données. Il cause une nécrose *Snn3* dépendant (*Snn3* étant le gène de sensibilité dominant du blé), et interagit avec une Pathogenesis-related Protein 1-1 (PR1-1) du blé, une protéine très importante pour les réactions de défense de la plante. Cependant, la mutation de résidus de Tox3 nécessaire pour l'interaction avec PR1-1 n'abolit pas sa capacité à provoquer des nécroses. Cette observation est inédite dans le sens que jusqu'à présent, l'hypothèse était que les effecteurs nécrotiques ne servaient qu'à provoquer des nécroses afin de faciliter l'infection des agents pathogènes nécrotrophes. Mais d'après ces résultats il semble que Tox3 ait un double rôle : il déclenche une nécrose *Snn3*-dépendante, mais il est également impliqué dans le contournement des réactions de défense basales de la plante en agissant directement sur PR1-1.

Les polyamines sont des composés organiques retrouvés chez la plupart des organismes vivants. Chez les champignons ils sont impliqués dans des processus aussi divers que la régulation du cycle cellulaire, la signalisation, la mort cellulaire, la différenciation cellulaire, la modulation de la porosité de la paroi, et bien d'autres. Chez *Magnaporthe oryzae*, 3 gènes sont impliqués dans leur synthèse. Parmi eux, *Smt1* (Spermine synthase family) est requis pour la pathogénie du champignon. **Raquel Rocha** (*University of Nebraska-Lincoln*, Etats-Unis) a montré que les mutants $\Delta smt1$ forment des appressoriums, mais pas de pénétration peg ou d'hyphes invasives. L'appressorium est formé mais n'adhère pas à la paroi. De plus, la concentration en glycérol dans les appressoriums $\Delta smt1$ est plus faible à cause d'un déficit de porosité. Il semblerait que cette diminution de l'accumulation du glycérol soit responsable d'une diminution de la pression de turgescence appliquée au niveau du pénétration peg, et subséquemment d'un déficit de pénétration des appressoriums.

Mingshen Qi du *Department of Plant Pathology* à l'université d'Iowa (EU) a présenté ses travaux d'identification et de caractérisation fonctionnelle d'effecteurs de l'agent de la rouille du soja, *Phakopsora pachyrhizi*. Comme mentionné par Steeve Whithman lors du meeting satellite dédié aux rouilles fongique, Mingshen Qi et ses collègues ont identifié des effecteurs candidats chez *P. pachyrhizi* et sélectionnés 82 d'entre eux pour une approche d'effectoromique basée sur des tests de suppression de réponse hypersensible chez le tabac et l'arabette des effecteurs candidats délivrés par le système de sécrétion bactérien de type III, couplée à de la localisation subcellulaire dans le tabac. Un effecteur candidat nommé PpEC23 est une petite protéine sécrétée, riche en cystéines qui atténue la réponse hypersensible causée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 chez le tabac et le soja. PpEC23 localise dans le noyau des cellules de tabac lorsqu'il est exprimé transitoirement. Une approche de double-hybride en levure a permis de montrer l'interaction de PpEC23 avec un facteur de transcription GmSPL121. GMSPL121 est un répresseur de l'immunité des plantes.

Javier Palma-Guerrero (*ETH Zurich*, Suisse) et son équipe ont présenté leurs travaux sur le clonage du premier gène d'avirulence chez *Zymospetoria tritici*, pathogène du blé. Deux approches indépendantes ont permis l'identification du gène d'avirulence *AvrStb6*. Ils ont identifié une souche avirulente sur une variété de blé possédant le gène de résistance *Stb6*. Par des croisements de cette souche associés à des approches QTL, 9 gènes candidats pour *AvrStb6*, dont deux effecteurs, ont été identifiés. Par ailleurs des approches GWAS (Genome-Wide Association Study) de 100 souches de *Z. tritici* ont permis de confirmer l'identification du gène *AvrStb6*. Des approches de complémentation ont validé l'identification du candidat. *AvrStb6* est un gène surexprimé lors de la transition du stade biotrophe à nécrotrophe du pathogène ce qui suggérerait que la protéine serait un effecteur nécrotrophe dans les variétés sensibles. Le gène est localisé en région sub-télomérique et entouré par des éléments transposables. *AvrStb6* est fortement polymorphique dans la population, il y aurait donc une forte pression de sélection sur ce gène.

5. Session concurrente " Effecteurs et Petites Protéines Sécrétées riches en cystéines "

La session concurrente dédiée aux effecteurs des champignons a été ouverte par **Timothy Friesen** de l'Université du Dakota du Nord (EU) qui a présenté les travaux menés dans son équipe sur un effecteur de l'agent de la spetoriose du blé. *Parastagonospora nodorum* est un parasite nécrotrophe modèle dont l'effecteur ToxA a été le premier effecteur d'agent pathogène nécrotrophe caractérisé. Chez les nécrotrophes les effecteurs sont reconnus directement ou indirectement par des gènes de sensibilité dominants contribuant à une interaction compatible à l'inverse donc de la relation gène-pour-gène où la reconnaissance du pathogène induit la résistance de l'hôte. Ainsi SnTox1 de *P. nodorum* a été identifié comme effecteur interagissant avec la protéine de blé Snn1, une kinase associée à la paroi cellulaire. La reconnaissance de SnTox1 par Snn1 induit une interaction compatible mais déclenche également les réactions de défense. Comment *P. nodorum* peut survivre aux réactions de défenses déclenchées par l'interaction compatible ? SnTox1 est une petite protéine de 100 acides aminés qui contient 16 cystéines et présente une homologie structurelle avec des protéines kinases végétales et localise dans la paroi. Timothy Friesen et son équipe ont pu également montrer que SnTox1, en présence de chitinase, prévient la dégradation de la chitine *in vitro*.

Les organismes phytopathogènes biotrophes nécessitent un hôte vivant afin de compléter leur cycle de vie. Afin de contourner l'immunité végétale sans provoquer de dommages à la plante, ces organismes utilisent souvent une catégorie de petites protéines sécrétées collectivement regroupées sous le terme d'effecteur et impliquées dans le contournement des réactions de défense de la plante. A ce titre, *Ustilago maydis*, l'agent causal du charbon du maïs, est un excellent modèle pour l'étude de l'interaction entre un champignon biotrophe et sa plante hôte. Le génome d'*U. maydis* contient plus de 300 gènes codant pour des effecteurs putatifs, et un grand nombre d'entre eux ont déjà été validé et caractérisé. **Armin Djamei** (*Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology*, Autriche) s'est concentré sur les effecteurs d'*U. maydis* induisant la production d'auxine. Un candidat mis en évidence par ce crible, Aip1, induit une augmentation par deux de la quantité d'auxine in planta. La délétion d'Aip1 induit un déficit dans la virulence d'*U. maydis* sur maïs, ce qui valide son rôle d'effecteur. Quand il est exprimé transitoirement dans le tabac ou dans le maïs, cet effecteur est localisé dans le noyau des cellules végétales, et cette localisation nucléaire semble indispensable à l'induction du métabolisme de l'auxine et à la virulence d'*U. maydis* sur maïs. Des expériences de pull-down in planta suivi d'analyse en spectrométrie de masse ont été effectués afin de trouver des interactants potentiels pour Aip1. Ces analyses ont mis en évidence une interaction potentielle avec des ARF (« *auxin responsive factors* »), des facteurs de transcription de liant aux « *auxin response elements* » (AuxREs), qui ont eux-mêmes un effet activateur ou répresseur sur les gènes de réponse à l'auxine. Le modèle proposé est que Aip1 se lierait à des ARF impliqués dans un complexe répresseur et lèverait cette répression. En plus de leur intérêt dans la caractérisation fonctionnelle d'un effecteur de biotrophe, ces travaux pourraient permettre de développer un outil biotechnologique destiné à activer les gènes de réponse à l'auxine in planta.

Nicole Ludwig (*Max Planck Institute*, Allemagne) a également effectué un crible pour trouver de nouveaux effecteurs de *U. maydis*, mais en utilisant des critères différents. Suite à une analyse de RNAseq en condition d'infection, seuls les gènes les plus exprimés codant pour des petites protéines sécrétées ont été gardés. Sur les 125 candidats mis en avant, 88 ne possèdent pas d'homologues dans les bases de données (un autre critère classique dans les pipelines d'identification de gènes codant pour des effecteurs). Une approche de délétion systématique a permis de démontrer que 7 de ces candidats ont un effet visible sur la virulence du champignon. 5 d'entre eux sont conservés dans toutes les souches d'*U. maydis* séquencées. Des mutants délétés pour ces effecteurs sont capables de pénétrer la plante, mais pas de la coloniser. En condition d'infection, les effecteurs taggées à un fluorochrome sont localisés dans l'apoplasme mais ne sont pas transloqués dans les cellules végétales, comme c'est souvent le cas pour les effecteurs d'*U. maydis* lors de ce type d'expériences. Une analyse de pull-down en condition d'infection a permis d'établir qu'un de ces effecteurs, Stp1,

interagissait avec 3 autres de ces effecteurs, Stp3, Stp4 et Pep1. La réciproque est vraie lorsque les expériences de pull-down sont effectuées pour ces 3 autres effecteurs. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la formation de ce complexe hétéro-quadrimerique : l'interaction des effecteurs en complexe pourrait les protéger contre l'environnement apoplastique, connu pour être riche en protéases sécrétées. Un des effecteurs du complexe pourrait également aider à la translocation des autres dans la cellule végétale, ou masquer la reconnaissance d'un ou plusieurs autres effecteurs du complexe par une protéine de résistance. Enfin, le complexe pourrait être internalisé dans le noyau et moduler l'expression de gènes de défense du maïs. Certaines de ces hypothèses pourront être validées ou invalidées lorsque la localisation précise de ces effecteurs en condition d'infection aura été clairement établie.

E. Oliveira Garcia (*Kansas State University*, Etats-Unis) et son équipe s'intéressent à *Magnaporthe oryzae*, pathogène du riz. Les effecteurs cytoplasmiques de ce champignon sont associés à une structure spécialisée, le BIC (« *Biotrophic Interfacial complex* ») qui permet la sécrétion de ces effecteurs. Cependant la translocation de ces derniers dans le cytoplasme de l'hôte reste encore mal comprise.

Grâce à des protéines fluorescentes, E. Oliveira Garcia a pu observer que les effecteurs cytoplasmiques Bas1, Pwl1 et Pwl2 étaient sécrétés du BIC dans des vésicules. Par ailleurs, une inhibition de l'endocytose résulte en une accumulation des effecteurs cytoplasmiques dans le BIC et donne des BIC gonflés. Ces résultats montrent que la translocation des effecteurs se fait par endocytose. Cela suggère donc qu'il y aurait des effecteurs de *M. oryzae* capables de détourner la machinerie d'endocytose de la plante hôte pour transloquer ces propres effecteurs.

Gunseli Bayram Akcapinar (*Institute of Chemical Engineering*, Autriche) a présenté l'établissement d'une librairie d'hydrophobines chez les *Trichoderma* spp. avec diverses activités de surface. Les hydrophobines (HFB) sont de petites protéines amphiphiles, sécrétées et riches en cystéines qui montrent des activités de surfaces élevées et capables de former des complexes. Les HFB ont des rôles importants dans la croissance du mycélium et les *Trichoderma* spp. en possèdent le plus d'HFB chez les Ascomycètes. Pour construire une librairie exhaustive des HFB4 chez *Trichoderma*, Gunseli Bayram Akcapinar et ses collègues ont utilisé deux approches. D'abord, une approche de mutagenèse basée sur l'identification des résidus acide aminés sous sélection positive grâce à la structure 3D de HFB4 de *T. virens*. Les orthologues HFB chez les *Trichoderma* spp. générés ainsi ont été produites en levure puis testés pour leurs propriétés d'activités de surface. Tous les orthologues testés présentent une activité de surface supérieure sur verre.

Conclusions:

Ce congrès nous permis de discuter et d'échanger avec des scientifiques internationaux à la fois sur nos propres projets mais aussi sur les autres études portant sur les champignons. Il nous a permis d'avoir une vision plus globale des recherches réalisées sur les champignons filamenteux, ce qui est d'autant plus important dans le contexte de notre dernière année de thèse avec la rédaction du manuscrit. Nous avons eu également l'opportunité de présenter nos travaux sous la forme de poster. J'ai (Julie Gervais) par ailleurs reçu le prix de meilleur poster de la catégorie "Agents pathogènes et interactions mutualistes". Enfin ce congrès a été une occasion pour nous de créer des contacts avec la communauté scientifique internationale, notamment pour trouver une expérience postdoctorale après la thèse.

Nous tenons donc à remercier chaleureusement l'académie d'agriculture pour nous avoir accordé cette bourse Jean & Marie-Louise Dufrenoy afin d'assister à ce congrès qui a été bénéfique tant sur le plan personnel que professionnel.