



**Master Biologie des Plantes et des Micro-organismes,
Biotechnologies, Bioprocédés**

Parcours : Biologie Fonctionnelle des Plantes

Année Universitaire 2015-2016

**Utilisation d'effecteurs de *Phytophthora* spp. pour aider à la recherche de
géniteurs résistants chez les Solanacées**

Mathieu PIERRE

Unité de Recherche 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes

Equipe Résistances Durables chez les Solanacées (RDS)

Centre INRA - Provence-Alpes-Côte d'Azur

Soutenu le 13 Juin 2016

Remerciements

Je tiens à remercier la directrice de l'Unité, Véronique LEFEBVRE, pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire GAFL. Je souhaite remercier Evelyne JOUBERT-MAZELLIER pour avoir été toujours disponible à répondre à mes questions pour les suites administratives.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à Anne MASSIRE, Emmanuel SZADKOWSKI, Bernard CAROMEL, Nasradin TOUHAMI et Alexandre BACHELLEZ, pour leur encadrement, l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont fait vivre durant ces 6 mois au sein de l'équipe RDS.

Mes plus vifs remerciements vont tout naturellement à mes maîtres de stage, Véronique LEFEBVRE en particulier Gaëtan MAILLOT pour le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de cette période. Durant mon passage à l'unité GAFL, vous étiez toujours présents et disponibles pour répondre à mes questions sans oublier votre participation au cheminement de ce rapport. Vos connaissances et votre grande culture scientifique m'ont motivé à toujours en savoir d'avantage. A vos coté, j'ai pu développer un esprit critique et intégrer une confiance en moi.

Résumé

L'Oomycète *Phytophthora capsici*, agent responsable du mildiou du piment, est un pathogène qui cause des dégâts considérables sur les Solanacées. Malgré le nombre d'étude important sur les déterminants moléculaires jouant un rôle pendant l'interaction avec l'hôte, peu d'avancées sur la découverte de résistance et très peu de géniteurs résistants ont identifiés à ce jour. Afin de parvenir à une gestion durable de la résistance, l'identification de nouvelles sources diversifiées de résistance est obligatoire. A cette fin, la stratégie effectormique qui consiste en l'exploitation des connaissances sur des gènes effecteurs RxLR de *P. capsici*, impliqués dans l'interaction avec son hôte, est une voie prometteuse pour identifier des géniteurs résistants de piment *a priori* durables. Au cours de ce stage j'ai identifié à partir d'un jeu de données RNA-seq des effecteurs RxLR à profils contrastés pour faire de la validation fonctionnelle *in planta*. J'ai pu caractériser de manière macroscopique, microscopique et moléculaire l'interaction de *P. capsici* avec le piment. Les résultats obtenus montrent que l'accession CM334 est partiellement résistante à l'isolat Pc107. Ces résultats viennent confirmer des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire d'accueil Les expériences d'agroinfiltration ont montrés que l'interaction *Agrobacterium*-piment masque l'expression transitoire des effecteurs RxLR et que l'utilisation du virus PVX comme vecteur intermédiaire pour exprimer les gènes RxLR semble être une alternative prometteuse.

Mots clés : *Phytophthora capsici*, RxLR, résistance, agroinfiltration, piment

Abstract

The Oomycete *Phytophthora capsici*, agent responsible of the downy mildew of pepper is a plant pathogen that causes considerable damages to the Solanaceae. Despite the number of important studies on the molecular determinants that play a role in the interaction with the host, little advances on the discovery of resistance have been made, and very few genitors have been identified so far. The current concern is to identify new genitors which would be durably resistant. In this way, the effectoromic strategy, which consists of exploiting knowledge on the effector genes RxLR of *P. capsici* involved in the interaction with its host, is necessary to identify resistant genitors of pepper theoretically durable. To this end, effectoromic strategy, which exploits the knowledge on RxLR genes (effectors) of *P. capsici* involved in the interaction with its host, is an already demonstrated strategy to effectively identify resistant pepper lines. During this training, from a data set of RNA-seq I have identified some RxLR effectors with contrasted profiles to make the validation functional *in planta*. I have characterized macroscopically microscopically and molecularly the interaction of *P. capsici* with pepper. The results obtained show that the accession CM334 is partially resistant to the strain Pc107. These results came to confirm previous work that has been conducted in the host laboratory. The agroinfiltration experiment show that the *Agrobacterium*-pepper interaction prevents the transitory expression of RxLR effectors and that the use of the virus PVX as intermediate vector to express the RxLR genes seems to be a promising alternative.

Keywords : *Phytophthora capsici* , RxLR, resistance, agroinfiltration, pepper

Avant-propos

L'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) est un organisme public de recherche divisé en plusieurs départements et accueillant plusieurs unités de recherches. Le centre d'INRA PACA est constitué de 26 unités de recherches, localisées sur 10 sites. Le GAFL (Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes) est l'une des unités constituantes de l'INRA PACA qui se trouve à Avignon. Elle appartient au département de Biologie et Amélioration des plantes. L'unité GAFL est centrée sur l'exploitation des génomes et de la diversité des ressources génétiques, ainsi que sur la méthodologie de sélection, pour certaines espèces maraichères et fruitières (*Prunus*). Les études menées au sein du GAFL sont orientées vers quatre axes de recherche : caractérisation fonctionnelle des interactions plantes/pathogènes, bases génétiques et moléculaires de la qualité des fruits, gestion durable des résistances, intégration de la résistance aux maladies et de la qualité des fruits pour des recherches innovantes en génétique. L'unité de recherche GAFL est subdivisée en six équipes. Mon stage a été effectué au sein de l'équipe Résistances Durables chez les Solanacées (RDS). Cette équipe s'intéresse à (i) l'exploration de la diversité de la résistance génétique contre les phytopathogènes, (ii) la compréhension des déterminants moléculaires et fonctionnelles des interactions plante-pathogène ainsi que leur histoire évolutive et (iii) la prédiction des risques de contournement de la résistance par les phytopathogènes afin de promouvoir des stratégies de sélection variétale et de déploiement des cultivars plus résistants. L'objectif principal est de développer un système modèle facilitant la caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans l'interaction *Phytophthora*/Solanacées ; d'identifier des géniteurs de résistances durable aux *Phytophthora* spp. et de développer une alternative crédible aux modèles conventionnels de production. Ces recherches sont menées sur des plantes d'intérêt agronomique Tomate et Piment, par des approches pluridisciplinaires de biologie moléculaire, génétique, biochimie, biologie cellulaire et physiologie.

Abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique	LB: Luria Bertani
ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire	MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
ARN : Acide Ribonucléique	NLP: Necrosis-inducing proteins
ARNm: Acide Ribonucléique messenger	PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
Avr: Avirulence	Pb : Paire de base
CM334: Criolo de Morenos 334	Pc : Phytophthora capsici
CRN: Crinkling and Necrosis	PCR : Polymerase Chain Reaction
dNTP: Désoxyribonucléotides Triphosphate	PRR : Pattern Recognition Receptors
DO : Densité Optique ADN:	PTI : PAMP-triggered immunity
dpi : Day post-inoculation	PVX : Potato virus X
EF1 α : Elongation Factor 1 alpha	QTL : Quantitative trait locus
ERO : Espèces réactives de l'Oxygène	R : Résistance
ETI : Effector-triggered immunity	RDS : Résistances durables chez les solanacées
ETS : Effector-triggered sensibility	RNA-seq : Sequençage d'ARN
GAFL : Génétique, Amélioration des Fruits et Légumes	Rpm : rotation par minute
GFP : Green Fluorescent Protein	RT-qPCR :quantitative real-time reverse transcription-PCR
Hpi : Heure post-inoculation	Ssp.: species (toutes les espèces)
HR : Hypersensibilité	Tm : Melting temperature
INRA : Institut National de Recherche Agronomique	YW : Yolo Wonde

Sommaire

Introduction.....	1
<i>Interaction plante-microorganisme.....</i>	<i>1</i>
<i>Les oomycètes</i>	<i>2</i>
<i>Les Phytophthora spp. : des pathogènes hémibiotrophes.....</i>	<i>2</i>
<i>Pathosystème Piment - P. capsici.....</i>	<i>4</i>
Objectif du stage	5
Matériels et méthodes	6
<i>Matériel Végétal.....</i>	<i>6</i>
<i>Matériels cryptogamiques.....</i>	<i>6</i>
<i>Inoculation des plantes.....</i>	<i>6</i>
<i>Suivie de croissance du pathogène sur milieu V8 gélosé sélectif.....</i>	<i>7</i>
<i>Analyse de l'expression des gènes marqueurs de P. capsici</i>	<i>7</i>
<i>Extraction des ARN totaux.....</i>	<i>7</i>
<i>Production des amorces pour amplification des gènes de ménage et des gènes marqueurs de P. capsici.....</i>	<i>7</i>
<i>Rétro- transcription des ARN messagers et conditions d'amplification des gènes de ménage de P. capsici.....</i>	<i>8</i>
Identification des RxLR de <i>Phytophthora capsici in silico</i>	8
Expression transitoire des effecteurs RxLR.....	8
<i>Agroinfiltration.....</i>	<i>9</i>
<i>Agroinfection au PVX.....</i>	<i>9</i>
Clonage des effecteurs RxLR	10
Résultats.....	11
<i>Validation de la présence de P. capsici dans les échantillons inoculés.....</i>	<i>11</i>
<i>Caractérisation des marqueurs moléculaires de P. capsici par amplification PCR.....</i>	<i>11</i>
<i>Mesure de longueur des nécroses et suivie de croissance du pathogène sur milieu V8 gélosé sélectif</i>	<i>12</i>
<i>Développement de P. capsici sur le milieu V8 gélosé.....</i>	<i>12</i>

Expression in planta	13
<i>Test d'agroinfection et agroinfiltration</i>	13
<i>Amplification par PCR des séquences RxLR pour le clonage Gateway</i>	14
Discussion	15
<i>Les gènes de ménage de P. capsici sont exprimés dans les échantillons de piment préalablement inoculés</i>	15
<i>Cinétique de progression des symptômes de P. capsici chez le piment</i>	15
Expressions in planta	17
<i>Les symptômes causés par l'interaction Agrobactérie-piment empêchent la mise en place de test d'expression transitoire par la méthode d'agroinfiltration</i>	17
<i>L'utilisation de virus par agroinfection comme vecteur intermédiaire pour exprimer nos gènes d'intérêt est prometteuse</i>	18
<i>Amplification des effecteurs RxLR</i>	19
Références bibliographiques.....	20

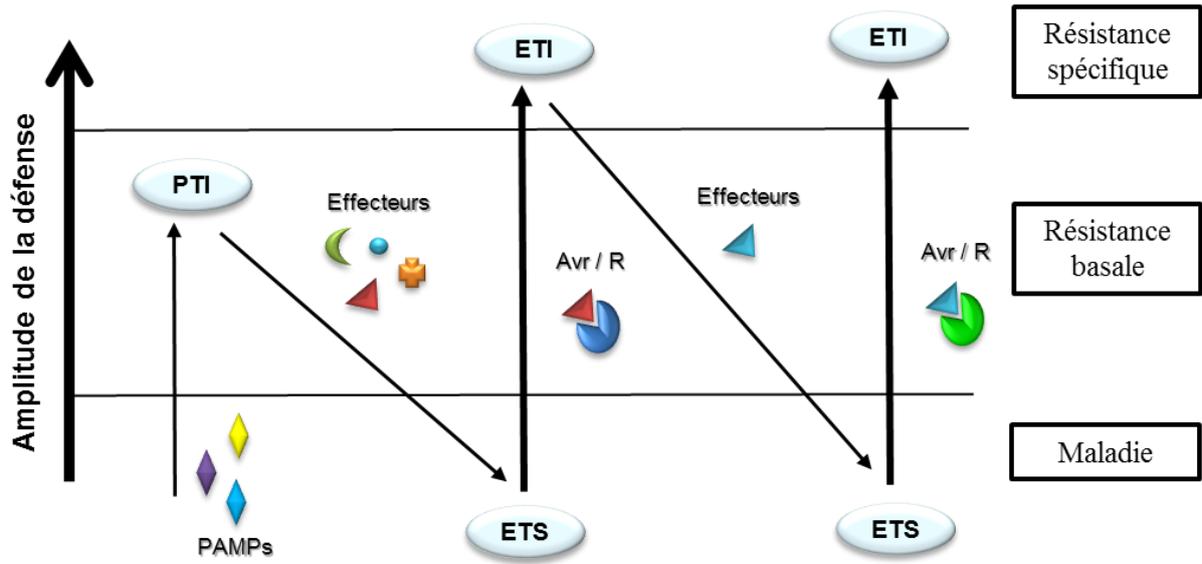


Figure 1 : Modèle en zig-zag illustrant le système immunitaire des plantes et la coévolution des mécanismes de défense des plantes et d'attaque des agents pathogènes. PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns, PTI PAMP-triggered immunity, ETS: Effector-triggered sensibility, ETI: Effector-triggered immunity, Avr: avirulence, R: résistance (D'après Jones J.D. et Dangl J.L., 2006)

Introduction

Interaction plante-microorganisme

Les plantes sont des organismes sessiles en contact permanent avec une multitude de microorganismes. Beaucoup de ces microorganismes sont des agents pathogènes tels que des bactéries, des virus, des champignons et des oomycètes (Rietman, 2010). Peu d'interactions donnent lieu au développement de symptômes et à la multiplication de ces pathogènes. Ceci est dû à la capacité des plantes à adapter leur physiologie et leur développement afin d'empêcher ou au moins de réduire les effets néfastes des microorganismes. Les plantes sont capables de percevoir et de réagir aux différents signaux de stress biotiques et abiotiques (Greco *et al.*, 2012). Selon le modèle en zigzag présenté par Jones & Dangl, 2006 les plantes possèdent deux lignes de défense : une première qu'on appelle défense basale (constitutive) et une seconde connue sous le nom de défense spécifique, souvent appelée résistance. Le premier niveau de défense est formé par l'ensemble des barrières physiques de la cellule en particulier la cuticule et la paroi cellulaire, et par des réactions de défenses non-spécifiques. Cette première défense basale (ou PTI pour *PAMP Triggered Immunity*) est activée quand les plantes perçoivent *via* leurs récepteurs membranaires PRRs (*Pattern Recognition Receptor*) les motifs moléculaires associés des pathogènes (PAMPS). Elle est peu spécifique mais permet toutefois de limiter la propagation du pathogène. Les parois lignifiées sont imperméables aux agents pathogènes. Certaines plantes secrètent des molécules antimicrobiennes (tels que les alcaloïdes, les phytoanticipines, les phytoalexines et les composées phénylpropanoïques) et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) afin de limiter la propagation de l'agent pathogène (Jiang & Tyler, 2012). Certains pathogènes parviennent à s'affranchir de ces barrières physiques en infectant les plantes *via* les orifices naturelles (stomates, blessures). Pour contourner la défense basale, les pathogènes produisent des effecteurs qui réussissent à supprimer la défense basale (PTI) et favorisent leur développement ; dès lors, la plante devient sensible et on parle d'*Effector Triggered Susceptibility* (ETS) (Abramovitch *et al.*, 2006) (**Figure 1**). Parallèlement à l'évolution des agents pathogènes, les plantes ont développé des récepteurs cytosoliques spécifiques capables de percevoir ces effecteurs et de permettre le déclenchement de la

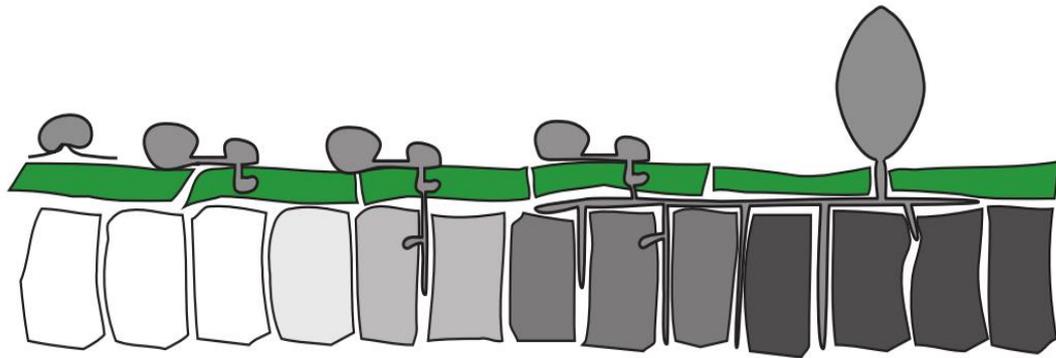
deuxième ligne de défense (défense spécifique). Ce système de défense spécifique implique des événements cellulaires complexes qui conduisent à une résistance vis-à-vis de certains pathogènes. La coévolution hôte-pathogène a permis à certaines plantes de développer des gènes de résistance (*R*) spécifiques qui reconnaissent de manière directe ou indirecte les gènes *Avr* des pathogènes et confèrent une résistance ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones & Dangl, 2006). L'interaction des gènes de résistance (*R*) et (*Avr*) activent des cascades de signalisation complexes pouvant conduire localement à une réaction d'hypersensibilité (HR), ainsi qu'à la mise en place d'une résistance systémique au niveau de la plante entière.

Les oomycètes

Parmi les agents pathogènes les plus importants des dicotylédones (Lamour & Kamoun, 2008), on trouve les oomycètes. Ce sont des organismes eucaryotes hétérotrophes du groupe des straménopiles qui partagent des caractéristiques communes avec les champignons. Ils peuvent parasiter les animaux ou les plantes. Les oomycètes regroupent plusieurs espèces de pathogènes, on retrouve également des pathogènes de l'ordre des *Saprolegniales* qui parasitent les poissons et les amphibiens. Les espèces les plus néfastes au monde des oomycètes appartiennent aux genres *Phytophthora* spp (Blair *et al.*, 2008), les *Peronospora*, des *Plasmopora*, les *Aphanomyces* et les *Bremia*. Ils sont responsables des mildious (Kamoun, 2003; Göker *et al.*, 2007). Les oomycètes phytopathogènes causent des maladies dévastatrices sur les plantes cultivées, ornementales et forestières.

Les *Phytophthora* spp. : des pathogènes hémibiotrophes

Les espèces du genre *Phytophthora* sont extrêmement destructrices sur un large éventail de plantes importantes pour l'agriculture et pour l'écosystème naturel (Kamoun, 2003; Jupe *et al.*, 2013). *Phytophthora infestans* est à l'origine de la grande famine d'Irlande qui s'est produite au 19ème siècle ; il est spécifique du genre *Solanum*. *Phytophthora ramorum* attaque de nombreuses espèces ligneuses, forestières et ornementales, il est aussi l'agent responsable de l'épidémie de la maladie subite du chêne (*Quercus agrifolia*) (Rizzo *et al.*, 2005).



Phase biotrophie

Phase nécrotrophie

Figure 2 : Schéma représentant les phases du cycle d'infection de *Phytophthora capsici*.
(D'après Lamour *et al.*, 2012)

Les *Phytophthora* spp. sont des pathogènes hémibiotrophes, avec un cycle de vie comportant une phase biotrophe suivie d'une phase nécrotrophe (Pain & Hertz-Fowler, 2010; Jupe *et al.*, 2013) (**Figure 2**). Durant la phase biotrophe cruciale pour l'infection et l'établissement de la maladie (Dodds & Rathjen, 2010), ils interagissent avec l'hôte sans causer la mort cellulaire (Perfect & Green, 2001).

Au cours de cette phase, le microorganisme développe des structures d'alimentation spécialisées appelées *haustoria* qui facilite ainsi le dialogue moléculaire entre le microorganisme et l'hôte. Puis il colonise l'hôte en se développant dans les espaces intercellulaires, et induit une mort cellulaire. Ainsi est initiée la phase nécrotrophe. Les structures de reproduction se forment alors, permettant ensuite la dissémination des spores et le lancement d'un nouveau cycle infectieux (**Figure 3**). Pour établir et mener à son terme une infection, les pathogènes ont besoin de moduler les processus métaboliques et physiologiques de l'hôte. A cette fin, ils sécrètent de petites protéines qu'on appelle des effecteurs (Jones & Dangl, 2006b; Hogenhout *et al.*, 2009). Ces effecteurs ont la capacité de modifier la structure cellulaire de la plante hôte et facilitent l'infection. La reconnaissance de ces protéines effectrices par l'hôte conduit à l'activation des gènes de défense de la plante (Kamoun, 2006).

Chez les *Phytophthora* spp, deux catégories d'effecteurs ont été décrites. (i) Les effecteurs apoplastiques sécrétés dans l'espace intercellulaire correspondent à des toxines ou des enzymes hydrolysables qui perturbent généralement le mécanisme de défense basale de la cellule végétale. (ii) Les effecteurs cytoplasmiques qui sont d'abord sécrétés puis transloqués dans le cytoplasme des cellules hôtes ; ils perturbent voire suppriment la transduction du signal et la régulation des gènes responsables de la résistance spécifique de l'hôte (Hein *et al.*, 2009). Deux classes d'effecteurs cytoplasmiques ont été caractérisées : les CRinklers Necrosis usuellement dénommées les CRN, qui ont été identifiés chez *P. infestans* et codent pour des protéines sécrétées induisant des nécroses dans la plante hôte (Torto *et al.*, 2003). Celles qui possèdent un motif protéique conservé RxLR (Arginin – X – Leucine – Arginine, X pouvant être n'importe quel acide aminé) dans les extrémités N-terminales de la protéine, usuellement dénommées les RxLRs (Torto *et al.*, 2003; Whisson *et al.*, 2007; Fabro *et al.*, 2011; Rajput *et al.*, 2015). Le motif RxLR pouvant lui-même être suivi d'un motif Aspartate-Glutamate-Glutamate-

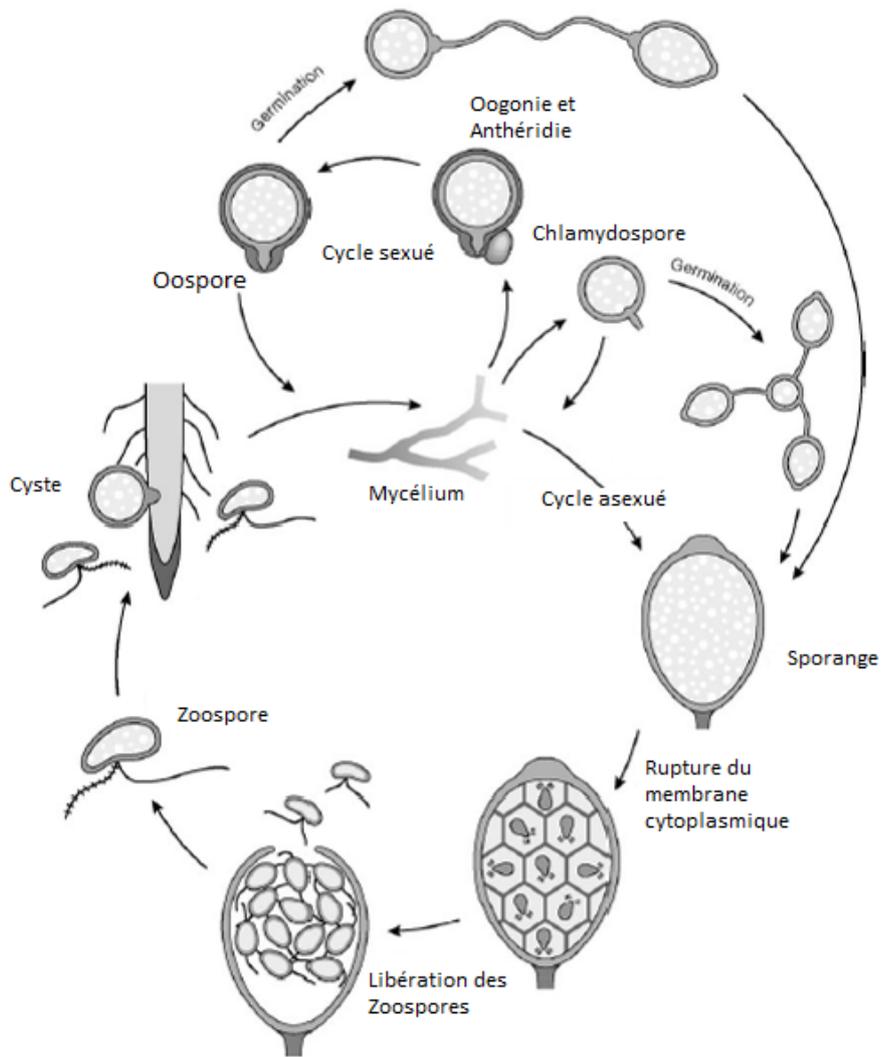


Figure 3: Cycle général du développement *Phytophthora* spp.

Arginine (dEER) (**Figure 4**). Le domaine RxLR est nécessaire et suffisant pour la translocation des protéines effectrices dans les cellules hôtes (Whisson *et al.*, 2007; Dou *et al.*, 2008).

Le séquençage à haut débit de plusieurs génomes d'oomycètes a, au cours des 5 dernières années, considérablement augmenté le volume d'informations que nous avons sur les effecteurs de *P. sojae* et *P. ramorum* (Tyler *et al.*, 2006), *P. infestans* (Haas *et al.*, 2009) et *P. capsici* (Lamour *et al.*, 2012). Ainsi, la prédiction de gènes codants des effecteurs candidats devient possible grâce à ses travaux.

Pathosystème Piment - *P. capsici*

L'oomycète *P. capsici* Leonian est un pathogène dévastateur pour beaucoup de cultures agricoles. Il a été rapporté pour la première fois par Leon H. Leonian en 1922 et est actuellement considéré comme l'un des 10 agents phytopathogènes les plus importants des oomycètes (Kamoun *et al.*, 2014). Sur le piment, *P. capsici* est responsable de dégâts importants. Les pertes peuvent facilement atteindre plus de la moitié de la récolte, voire la détruire totalement.

Le pathogène provoque un flétrissement de la plante. Celui-ci est provoqué par la pourriture du collet et des racines, il peut aussi toucher les parties aériennes de la plante. L'un des facteurs qui rend *P. capsici* persistant et difficile à contrôler est que le pathogène produit deux types de spores qui s'adaptent chacune à des conditions environnementales différentes. Les spores sexuées (oospores) qui peuvent vivre pendant plusieurs années dans des sols infestés. Les spores asexuées (zoospores) sont quant à elles libérées par les sporanges développés sur les tissus végétaux infestés. Les zoospores se propagent à la surface des eaux courantes grâce à leurs flagelles et peuvent nager vers les racines des plantes hôtes (Hausbeck & Lamour, 2004). La lutte chimique et la rotation des cultures associées à des méthodes prophylactiques sont insuffisantes pour lutter contre ce microorganisme.

Les mécanismes de pathogénicité de *P. capsici* sont encore peu connus. Plusieurs équipes se sont intéressées aux déterminants moléculaires impliqués et cherchent à comprendre et expliquer le comportement de *P. capsici vis-à-vis* de son hôte. Des travaux menés par Jupe *et al.*, 2013; Stam *et al.*, 2013b ont permis d'identifier 516 RxLRs et 84 CRN chez *P. capsici*.

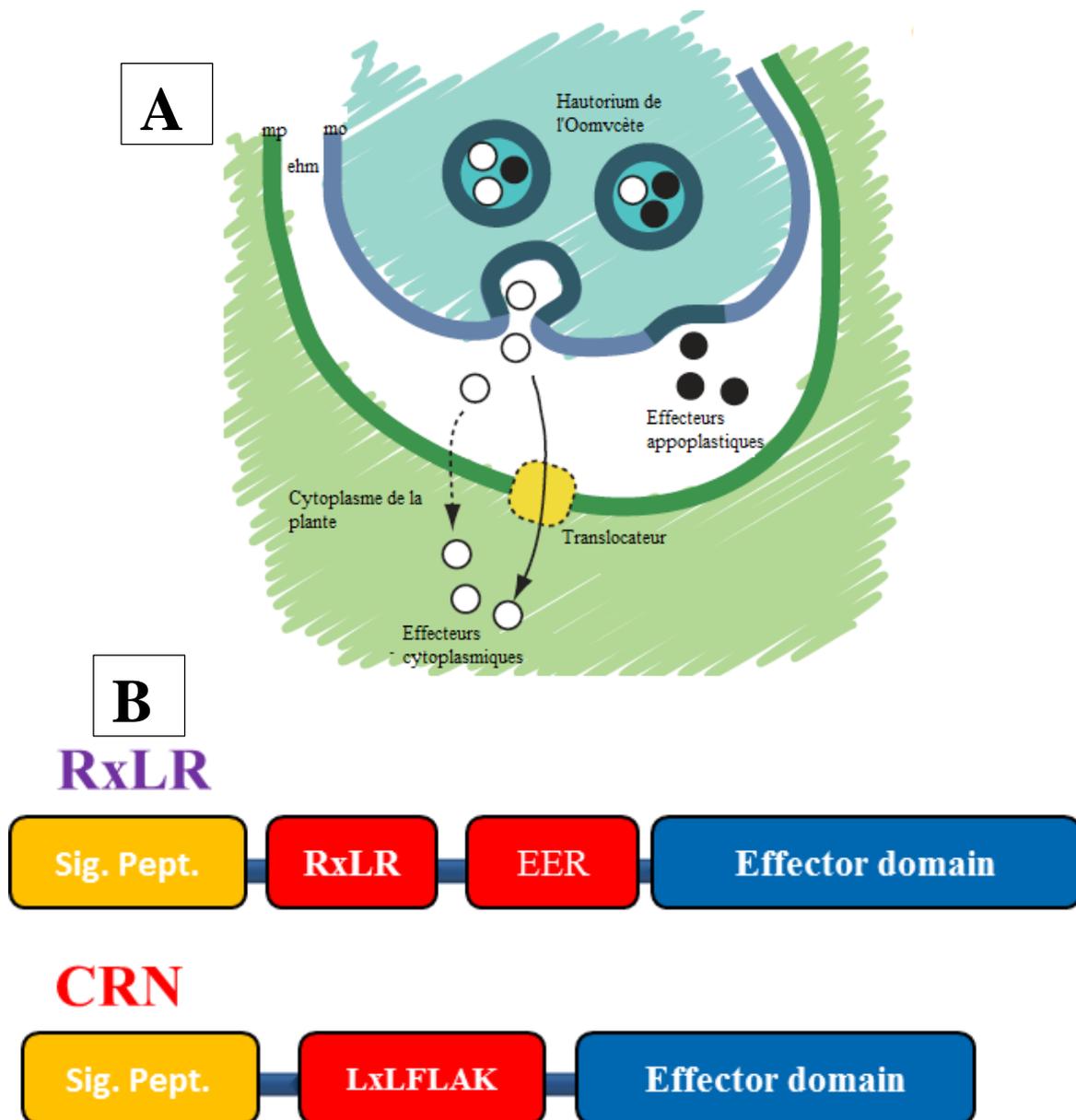


Figure 4 : Vue schématique des deux classes d'effecteurs et les deux types d'effecteurs cytoplasmiques.

A : Les effecteurs apoplastiques (cercles noirs) sont sécrétés dans l'espace intercellulaire où ils interfèrent avec les défenses apoplastiques des plantes. Les effecteurs cytoplasmiques (cercles blancs), ils sont transloqués à l'intérieur du cytoplasme des cellules hôtes en traversant les membranes du pathogène et de la plante. B : Les effecteurs cytoplasmiques de type RxLR et CRN ; les deux d'effecteurs contiennent chacun un signal peptide en amont de leurs motifs de translocation respectifs et un domaine effecteur dans la leur partie C-terminale. Membrane plasmique de la plante (mp), membrane de l'Oomycète (mo), matrice extra-haustoriale (ehm), Signal peptide (Sig.Pept.). D'après (Schornack *et al.*, 2009)

Plusieurs équipes ont cherché des résistances génétiques pour proposer une alternative à la lutte chimique. Les résultats de ces recherches ont permis de montrer que la résistance du piment à *P. capsici* est principalement de nature quantitative. Différentes études menées sur plusieurs génotypes de piment ont permis d'identifier des QTL majeurs (Thabuis *et al.*, 2003). Ces QTLs ont été détectés chez plusieurs accessions non-commerciales (Mallard *et al.*, 2013).

Les résultats des études sur la résistance chez le piment face à *P. capsici* montrent que cette résistance est principalement quantitative (polygénique). Beaucoup d'études ont été entreprises mais aucune n'est allée jusqu'aux gènes impliqués dans la résistance, ce qui explique les limites des approches de génétiques conventionnelles. Depuis quelques années une nouvelle approche se basant sur l'utilisation des données de séquençage de nouvelles générations s'est développée. C'est l'approche effectormique (Vleeshouwers *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2009; Bozkurt *et al.*, 2012). Cette approche est basée sur la compréhension du mécanisme de pathogénicité des effecteurs. Depuis son développement, des équipes de recherches l'ont utilisée pour identifier des couples *Avr/R* chez *P. infestans* et chez *P. sojae* (Vleeshouwers & Oliver, 2014). Malgré la production de données transcriptomiques sur *P. capsici* et sur les différentes familles d'effecteurs (Jupe *et al.*, 2013; Stam *et al.*, 2013a), il y a peu d'études d'effectormique utilisant les RxLR de *P. capsici* pour la recherche de nouvelles sources de résistance. Par contre, cette approche a été utilisée par Feng et ses collaborateurs pour la caractérisation des NLP (Necrosis-inducing proteins) (Feng *et al.*, 2014).

Objectif du stage

L'équipe d'accueil où j'effectue mon stage travaille sur la génétique des résistances aux maladies du piment et sur la durabilité des résistances. Pour étudier les facteurs influençant l'issue de l'interaction Piment-*P. capsici* ; un jeu de données RNA-seq a été produit où 2 accessions hôtes interagissent avec 2 isolats de *P. capsici* (différents niveaux de résistance et différents niveaux d'agressivité des isolats). L'analyse de ces données a montré que les isolats de *P. capsici* expriment des gènes différents selon qu'ils interagissent avec l'accession de piment résistante

ou sensible. Parmi ces gènes dont l'expression a été modifiée, des effecteurs RxLR ont été identifiés.

L'objectif de l'équipe est d'utiliser les effecteurs RxLR de *P. capsici* dans un pipeline d'analyse de type effectoromique pour rechercher de nouveaux géniteurs de piment résistants. Parmi ces gènes où l'expression a été modifiée, des effecteurs RxLR ont été identifiés.

Mon stage s'inscrit dans cette démarche et se base sur les données produites par le RNAseq. Les objectifs sont au nombre de 3 :

1. Identifier des effecteurs candidats
2. Valider la présence de *P. capsici* dans l'interaction avec le piment
3. Mettre au point l'analyse d'expression *in planta*

Matériels et méthodes

Matériel Végétal

Quatre génotypes de piment de l'espèce *Capsicum annuum* ont été utilisés : le génotype sensible Yolo Wonder (YW) et les génotypes, partiellement résistants à *P. capsici*, Perennial, PM217 et Criollo de Morelos (CM334). Les plantules ont été repiquées en pot 15 jours après le semis et gardées en serre pendant 7 semaines à 18°C jour/22°C nuit. Les plantes ont été transférées en chambre de culture de niveau de confinement P3, 2 ou 3 jours avant de les utiliser pour les acclimater.

Matériels cryptogamiques

Deux isolats de *P. capsici* ont été sélectionnés dans la collection entretenue au laboratoire d'Avignon pour leur différence d'agressivité sur piment lors de tests pathologiques effectués avant mon arrivée : Pc273 isolé à partir d'une espèce appartenant à la famille des cucurbitacées au Tennessee (USA) qui est faiblement agressif, et Pc107 isolé sur piment dans le sud-est de la France qui est fortement agressif. Les isolats sont mis en culture sur milieu V8 gélosé de 7 à 10 jours à 25°C.

Inoculation des plantes

Trois conditions d'inoculation ont été utilisées : un témoin négatif (pastille V8 sans mycélium) ; Pc273 (pastille V8 avec mycélium de Pc273) et Pc107 (pastille V8 avec mycélium Pc107). Chaque plante est étêtée avec une lame de rasoir stérile, une pastille de milieu solide prélevée à l'emporte-pièce (diamètre 4mm) est déposée sur la tige fraîchement coupée et un morceau de papier d'aluminium est posé sur la tige de manière à protéger la pastille et maintenir une humidité favorable au développement de *P. capsici*. Aucune nécrose n'étant visible 24 heures après inoculation, les mesures de longueur de nécrose ont été commencées 3 jours après inoculation.

Suivie de croissance du pathogène sur milieu V8 gélosé sélectif

Des rondelles de 1 mm (8) de tiges ont été prélevées sous la nécrose sur les plantes à 24 et 72 heures après infection. Elles ont été déposées sur milieu V8 sélectif (Ampicilline, Rifampicine, PcNb, Pimaricine, Vancomycine) dans le but de confirmer la présence du pathogène.

Analyse de l'expression des gènes marqueurs de *P. capsici*

Extraction des ARN totaux

Des tissus ont été prélevés aux temps 24 et 72 heures après inoculation. Environ 5 mm de tige situées sous la nécrose ont été prélevés avec une lame de rasoir stérile. Les morceaux prélevés ont immédiatement été congelés dans l'azote liquide puis placés à -80°C. Les tissus congelés ont été broyés dans un mortier avec de l'azote liquide et les ARN totaux extraits selon les instructions du protocole du mini kit RNeasy Plant (QIAGEN France SAS). Les ARNs totaux ont ensuite été dosés à 260nm au NANODROP (NANODROP 1000 spectrometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) couplé au logiciel ND-1000 V3.7.1. La pureté des ARNs est vérifiée par la mesure des ratios DO260/DO280 et DO260/DO230 qui doivent être proche de 2.

*Production des amorces pour amplification des gènes de ménage et des gènes marqueurs de *P. capsici**

Tableau 1: Tableau récapitulatif des amorces des gènes marqueurs utilisées

Gènes	Id	Séquences (5'-->3')
Tubuline	Z4931F	AGGAGATGTTCAAGCGTGTG
Tubuline	Z4931R	GATCGTTCATGTTGGACTCG
Actine	Z4932F	ACTGCACGTTCCAGACGATC
Actine	Z4932R	CCACCACCTTGATCTTCATG
Ubc	Z4961F	CACTGCAACATCAACGCCAA
Ubc	Z4961R	TGGCATCCGTAAGCAGTGAG
EF1 α	Z4137F	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA
EF1 α	Z4137R	TGACAACACCAACAGCAACA

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées avec les extensions Gateway (couleur rouge) pour le clonage

Gènes	Id	Séquences (5'-->3')
RxLR_101354 / <i>P. capsici</i>	Z5005 F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGCTCACGATACCTG TGGGGA
	Z5005 R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTACGGCGATTGGTTGGA
RxLR_118417/ <i>P. capsici</i>	Z5006 F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGAGGCCCAAC GCCTT
	Z5006 R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTCACACCATGACTTGGTTC TTTAG
RxLR_129145 / <i>P. capsici</i>	Z5007 F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGACATCAAACCA GGGAGCCC
	Z5007 R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAGCATTACCCACACTTGT CT
RxLR_123179/ <i>P. capsici</i>	Z5008 F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGACAGAGTAATC GTTTCCGATG
	Z5008 R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCGTTTTTCTTGTGAAATCC TCCAC
RxLR_21908 / <i>P. capsici</i>	Z5009 F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGTCTGGTGATCGC CGTGG
	Z5009 R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTTAACCTTCGTCCGACTCG ATC

Les amorces utilisées ont été définies avec le logiciel Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) et synthétisées par le laboratoire EUROFINs. Les couples d'amorces sont définis dans la partie 3' de la région codante et amplifient des fragments de 100 à 300pb. Elles font 20-23 pb et ont une température d'hybridation d'environ 60°C et un pourcentage CG d'environ 50. La liste des amorces utilisées est donnée dans le Tableau (**Tableau 1**).

Rétro- transcription des ARN messagers et conditions d'amplification des gènes de ménage de P. capsici

Avant la rétro-transcription, les ARN totaux subissent un traitement à la DNase I afin d'éviter les traces d'ADN génomique. Les ARNs sont incubés pendant 5 min à 65°C en présence de 50 µM d'oligonucléotides oligo-dT(18) et de 10 mM de dNTP, puis ils sont conservés dans la glace pendant 1 minute. La rétro-transcription est réalisée en présence de 1µL de SuperScript III RT (Invitrogen), 4 µL de tampon de synthèse d'ADNc 5X, 1 µL de DTT 0.1 M, 40 U de RNase inhibitor. La réaction est catalysée pendant 1 heure à 50°C puis 15 min à 70°C pour inactiver la réaction. Les ADNc obtenus sont dilués au cinquième avec de l'eau ultra-pure.

Identification des RxLR de *Phytophthora capsici in silico*

Un premier filtre sur les données de RNA-seq de plantes inoculées a permis de lister 139 effecteurs de type RxLR issus de deux isolats de *P. capsici* exprimés dans l'interaction avec deux accessions de piment (CM334 et YW). Un deuxième criblage sur les données RNA-seq a permis de sélectionner 5 effecteurs de type RxLRs présentant des profils contrastés entre les différentes conditions.

Les critères de sélection sont :

Deux effecteurs des isolats Pc107 et Pc273 exprimés dans l'interaction avec les accessions CM334 et YW ont été choisis. Deux effecteurs de l'isolat Pc107 exprimés dans l'interaction avec CM334 et YW, ensuite un effecteur de l'isolat Pc273 exprimé dans l'interaction avec les deux accessions de piment.

Expression transitoire des effecteurs RxLR

Dans le but d'exprimer les effecteurs *in planta*, les stratégies d'agroinfiltration et agro-infection ont été expérimentées. L'agroinfiltration et l'agro-infection ont été réalisées suivant le protocole décrit par (Du *et al.*, 2014).

Agroinfiltration

Avant de procéder au clonage de nos effecteurs, un test de sensibilité du piment à l'agroinfiltration a été réalisé. Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (1D1249, 2260, GV3101 et AGL1) ont été utilisées à deux densité optique à 600 nm différentes (0,05 ; 0,1) pour ce test. Les 4 souches d'agrobactéries ont été mises en culture dans 5mL de milieu LB avec les différents antibiotiques appropriés (kanamycine 25 mg.L⁻¹, rifampicine 50 mg.L⁻¹, ampicilline 50 mg.L⁻¹ et chloramphénicol 10 mg.L⁻¹). Les tubes contenant respectivement les 4 souches d'agrobactéries ont été mis en culture pendant 48 heures à 28°C. La suspension bactérienne est ensuite centrifugée à 2500 rpm pendant 15 min, le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans 5 mL de solution d'Agromix (10mM MgCl₂, 150µM Acétosyringone, 10mM MES). La densité optique à 600 nm de l'inoculum a été ajustée à 0,05 et 0,01 juste avant l'agroinfiltration. Avec une seringue sans aiguille, les plantes ont été infiltrées avec les suspensions d'*Agrobacterium*.

Agroinfection au PVX

Les constructions sont composées d'un gène d'intérêt cloné dans un vecteur composé d'un PVX cloné dans un vecteur binaire. La souche d'*A. tumefaciens* GV3101 est transformée par le PVX cloné. Cinq constructions de vecteurs d'expression *in planta* (vecteur pGR106) fournies par le James Hutton Institute ont été utilisées pour l'agroinfection. La construction PVX :Crinkler2 (PITG_17199) qui induit des nécroses chez *N. benthamiana* et la tomate a été utilisé comme témoin positif. Les constructions PVX :GFP et PVX : ΔGFP ont été utilisés comme témoins négatif. PITG_16240 et PITG_09732#2 causent des HRs lorsqu'ils sont reconnus respectivement chez le piment et *N. benthamiana*. Les agro-bactéries contenant les constructions sont mise en pré-culture dans 5 mL de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés (kanamycine 50 mg.L⁻¹, gentamycine 25 mg.L⁻¹ et

tétracycline 5 mg.L⁻¹) pendant 48 heures. 300 µL du milieu contenant les agrobactéries ont été mises en culture sur 25 mL de milieu LB solide sur boîte de Pétri pendant 48 heures à 28 °C et à 200 rpm. Les plantes âgées de trois semaines ont été inoculées avec un cure-dent stérile préalablement trempé dans l'agrobactérie contenant le vecteur PVX recombinant. Trois points d'infection de chaque construction ont été faits sur trois feuilles par plantes. Des photos des feuilles détachées de nos plantes infectées ont été prises 19 jours après inoculation.

Clonage des effecteurs RxLR

Sur la base des résultats d'expression des gènes de *P. capsici*, des effecteurs présentant des profils contrastés entre les différentes conditions ont été choisis. La présence d'un signal peptide a été contrôlée avec l'outil **SignalP 3.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)

Pour le clonage des effecteurs, la stratégie GATEWAY (Thermo Fisher Scientific) a été utilisée. Cette technique est basée sur la capacité de recombinaison entre l'ADN du phage lambda et l'ADN d'*E.coli* via les sites att lors du cycle lysogénique. Le clonage de la séquence d'intérêt dans un vecteur de destination se fait en deux étapes :

1) La séquence d'ADN d'intérêt est d'abord amplifiée par PCR en utilisant des amorces hybrides possédant des extensions attB1 en 5' et attB2 en 3'. Ce produit de PCR permet par la suite de réaliser grâce à l'ajout d'extension attB la réaction BP avec les sites attP d'un vecteur d'entrée (pDONR).

2) Cette étape consiste en une réaction de combinaison appelée réaction LR entre les deux sites attL présent sur le vecteur d'entrée et les deux sites attR présents sur le vecteur de destination.

Les amorces pour l'amplification des séquences RxLR ont été définies avec le logiciel Primer3 et les séquences attb ont été ajoutées suivant le protocole fourni par le constructeur de la technologie GATEWAY. La liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR et les séquences de nos gènes d'intérêt sont répertoriées au (**Tableau 2**). L'enzyme Herculase II Fusion DNA Polymerase a été choisie pour l'amplification de séquences d'ADN.

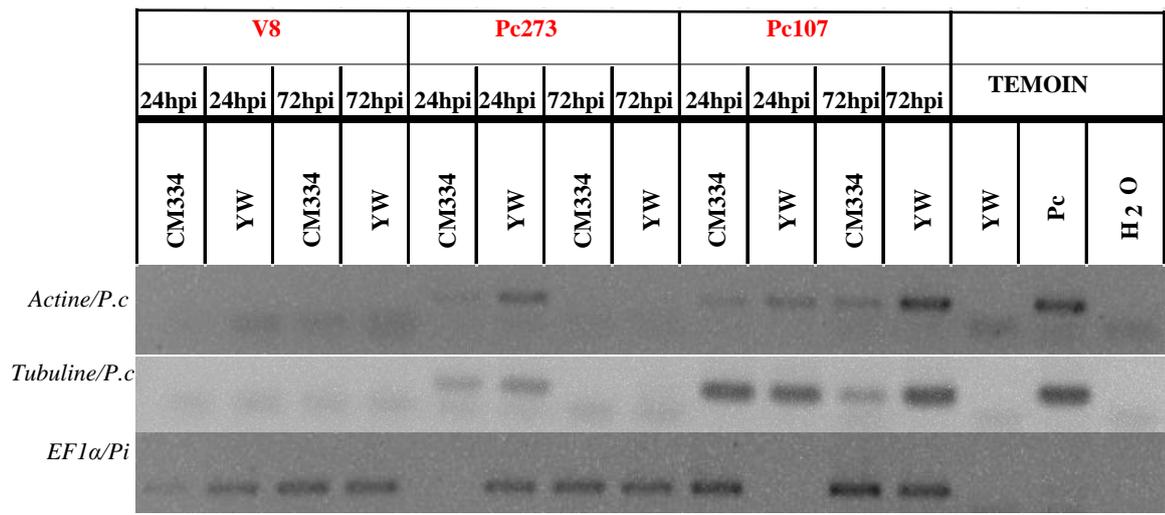


Figure 5 : Caractérisation moléculaire de la présence de *P. capsici* dans les tiges de piment (CM334 et YW) inoculées

L'expression des gènes de ménage de *P. capsici* (*Act* et *Tub*) a été caractérisée par RT-PCR sur des échantillons de CM334 et YW inoculés avec deux isolats différents (Pc273 et Pc107). Les échantillons ont été prélevés 24 et 72 heures post-inoculation (hpi) pour chaque condition. La condition V8 sert de témoin négatif et un gène de ménage du piment (*EF1α*) a été utilisé comme contrôle endogène. L'ADN génomique de Yolo Wonder (YW) et de *P.capsici* (*Pc*) a été utilisé comme témoin positif.

Résultats

Validation de la présence de *P. capsici* dans les échantillons inoculés

Caractérisation des marqueurs moléculaires de P. capsici par amplification PCR

Les résultats obtenus après amplification par PCR des gènes de ménage de *P. capsici* et d'un gène ménage de piment sont présentés dans la (**Figure 5**). Nous avons testé plusieurs gènes de ménages dans le but de caractériser la présence de *P. capsici* au niveau moléculaire (**Tableau1**). J'ai choisi de présenter les résultats pour seulement deux gènes de ménage de *P. capsici* (actine/*Pc* et tubuline/*Pc*) et un seul gène de ménage du piment (*EF1 α* /*Pi*). Une amplification a été observée pour le gène de ménage *Actine* sur les échantillons CM334 et YW prélevés 24 heures après inoculation (hpi) avec l'isolat Pc273. 72 heures après inoculation avec Pc273, la photo du gel n'a pas permis de révéler de fragments de cDNA amplifiés sur les échantillons CM334 et YW. Il est constaté que l'intensité d'amplification du cDNA de l'isolat Pc273 est plus importante sur YW comparativement à CM334. De même, pour l'isolat Pc107, une amplification de cDNA est observée sur les deux échantillons 24 et 72 heures après inoculation. L'intensité du fragment de cDNA amplifié est plus importante sur l'échantillon YW prélevé 72 heures après inoculation. Le même profil d'amplification est observé pour le gène *Tubuline* sur les échantillons en condition d'interaction avec Pc273. La photo du gel révèle l'amplification du gène *Tubuline* sur CM334 et YW 24 heures après inoculation, cependant aucun fragment de cDNA amplifié n'est observé à 72 hpi. Des fragments de cDNA du gène *Tubuline* amplifiés sont également observés pour les échantillons en condition d'interaction avec l'isolat Pc107. L'intensité des fragments amplifiés est à peu près similaire pour les échantillons prélevés 24 et 72 heures après inoculation, sauf pour le CM334 à 72 heures où on constate une diminution de l'intensité du fragment de cDNA amplifié. De manière concomitante, l'amplification des fragments de cDNA du gène de ménage du piment est observée sur les différents échantillons, aucun fragment amplifié n'est observé sur les échantillons Pc273-CM334 et Pc107-YW, ainsi que pour le témoin YW.

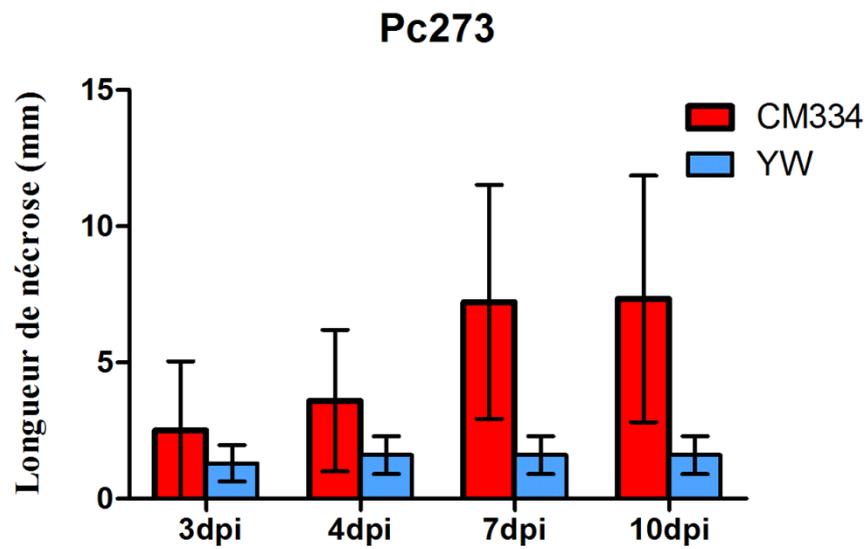
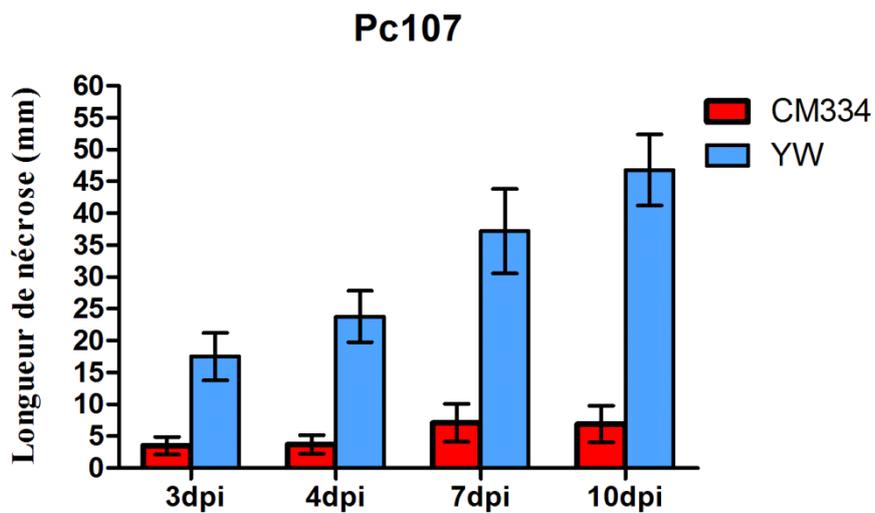
A**B**

Figure 6 : Mesure de longueur moyenne de nécrose sur des tiges de piment (CM334 et YW)

Les mesures ont été prises 3, 4, 7 et 10 jours post-inoculation (dpi). Les tiges décapitées ont été inoculées avec les isolats Pc273 et Pc107. Le nombre de plantes inoculées pour chaque génotype est égal à 10. L'erreur standard (SD) est ajoutée à chaque temps de mesure.

Mesure de longueur des nécroses et suivie de croissance du pathogène sur milieu V8 gélosé sélectif

L'évolution de la progression des symptômes a été suivie chez les deux accessions inoculées avec les deux isolats séparément (**Figure 6**). Les nécroses ont été observées à partir de 3 jours après l'inoculation. Des profils de nécrose contrastés ont été observés. Les mesures de longueur de nécrose ont été réalisées sur une période de 10 jours après inoculation sur les deux accessions testées. Trois jours après inoculation, certaines plantes de variété CM334 présentaient un phénotype anormal, les feuilles étaient flétries. Il est à noter que la présence d'un début de nécrose a été observée sur les deux génotypes (**Figure 6A, 6B**) dans les interactions avec le Pc107 et Pc273. Chez les plantes de YW inoculées avec l'isolat peu agressif Pc273, les nécroses ont une longueur moyenne de 3 mm dans les tiges. Le développement des nécroses sur YW, provoquées par Pc273, est quasiment stable durant la période du test ; la longueur moyenne mesurée passe de 1,44 mm (3dpi) à 1,60 mm (10dpi), soit une faible progression de 0,16 mm. Pour les plantes CM334 inoculées avec ce même isolat, la longueur moyenne mesurée à 3dpi est de 3,13 mm et progresse jusqu'à 10,40 mm à 10dpi ; cette augmentation de longueur moyenne de nécrose équivaut à 7,27 mm. La longueur moyenne des nécroses mesurée sur les plantes CM334 inoculées avec l'isolat Pc107 à 3dpi est égale à 3,89 mm et ces nécroses ont atteint une longueur moyenne de 7,44 mm au bout de 10 jours après inoculation. Les nécroses provoquées par ce même isolat sur les plantes YW font 17,5 mm de longueur à 3dpi et atteignent une longueur moyenne de 46 mm à (10dpi), une progression de nécrose plus importante que celle observée sur l'accession CM334 (**Figure 6B**).

*Développement de *P. capsici* sur le milieu V8 gélosé*

Les résultats de suivi de croissance de *P. capsici* dans les échantillons inoculés sur boîte de Pétri sont représentés sur la **Figure 7**. Des rondelles de tiges ont été prélevées sur les échantillons inoculés, 24 et 72 heures après inoculation, et ont été mises en culture sur milieu sélectif. Après 3 jours de mise en culture sur le milieu V8, du mycélium a commencé à se développer sur les boîtes contenant des

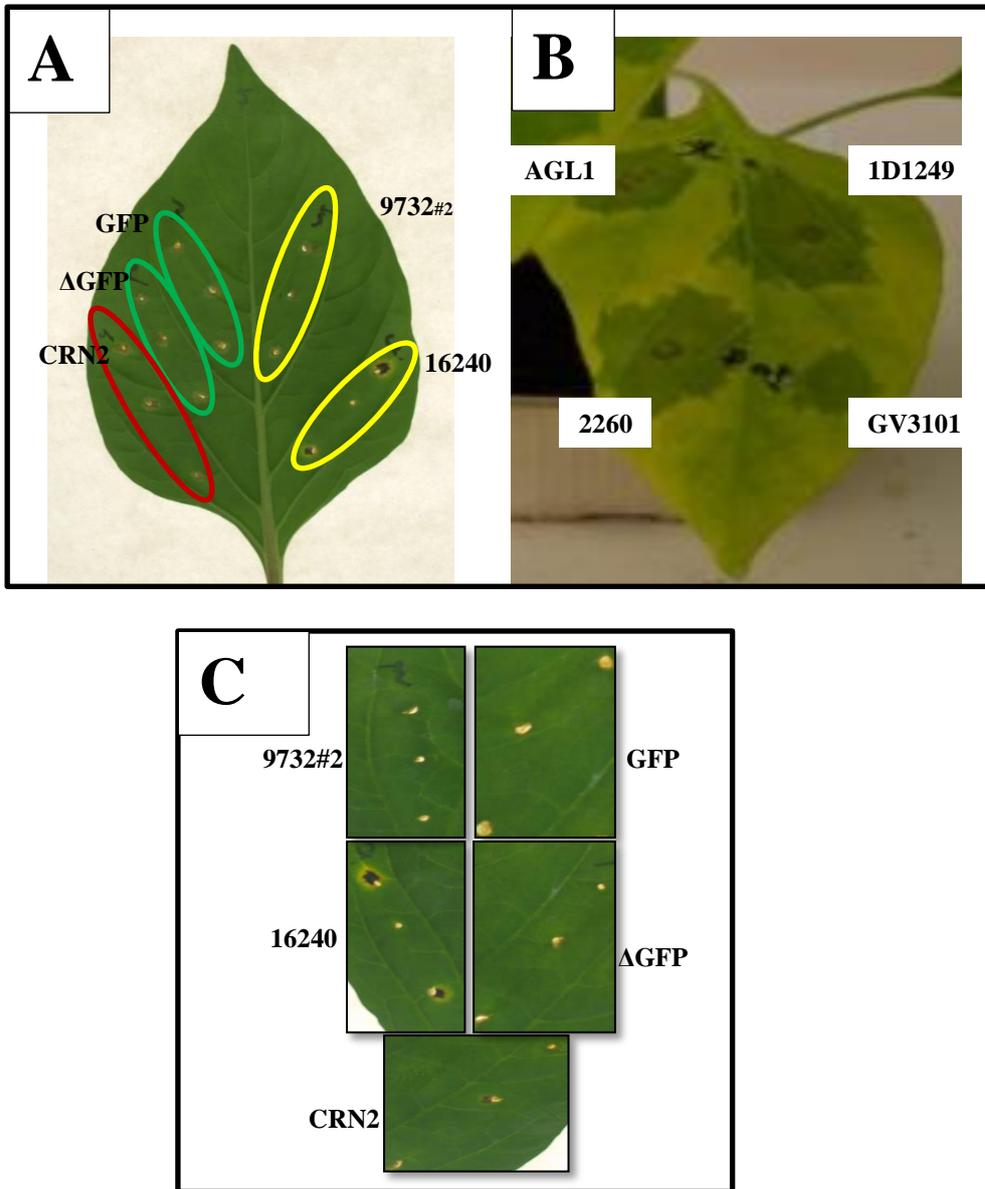


Figure 8 : Photos des Symptômes observés après agroinfection et agroinfiltration sur des feuilles de piment (Yolo Wonder).

- A. Les feuilles ont été inoculées au cure-dent avec la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contenant le vecteur binaire PVX (pGR106) qui exprime les gènes (GFP, ΔGFP, CRN2, PITG_09732#2 et PITG_16240). GFP et ΔGFP ont été utilisé comme témoins négatif, la construction 16240 présente des symptômes localisés au site d'inoculation comparativement aux autres points d'inoculation. Les symptômes obtenus ont été observés 19 jours après inoculation.
- B. Le panneau B correspond à l'expérience d'agroinfiltration sur les feuilles de piment (Yolo Wonder). Les feuilles ont été inoculées avec 4 souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (AGL1, 2260, 1D1249 et GV3101), DO=0,05. L'agroinfiltration provoque le jaunissement total de la surface foliaire. On notera que ces symptômes ont été observés 10 jours après inoculation.
- C. Le panneau C correspond aux points d'infection au PVX des 4 constructions pris en grand plan

rondelles de YW prélevées 24 heures après inoculation (**Figure 7A**). Cette observation du mycélium est faite sur les boîtes de Pétri contenant des rondelles de tige de YW préalablement inoculées avec l'isolat Pc107. Aucune croissance de mycélium n'a été observée pour les rondelles de CM334 inoculées avec Pc107 (**Figure 7B**).

Pour les plantes inoculées (CM334, YW) avec l'isolat Pc273, aucune croissance de mycélium n'a été observée après trois jours de mise en culture sur milieu V8 (**Figure 7C, 7D**).

Expression in planta

Test d'agroinfection et agroinfiltration

Ces tests ont été réalisés dans le but de vérifier le comportement du piment à l'agroinfiltration et agroinfection. Les résultats des expériences d'agroinfiltration et d'agroinfection réalisées sur les feuilles de la variété Criollo de Morelos 334 de piment sont reportés à la **Figure 8**. Les photos pour cette expérience ont été prises 19 jours après inoculation. La **figure 8B** représente une expérience indépendante d'agroinfiltration avec 4 souches différentes d'*Agrobacterium tumefaciens* vides. Elle montre le comportement adopté par le piment après agroinfiltration. Sur cette photo, seul le résultat pour le génotype YW est présenté. Sur les quatre génotypes où l'agroinfiltration a été testée, les feuilles de trois d'entre eux (CM334, YW et Perennial) montrent un jaunissement et finissent parfois par tomber. L'accession PM217 ne produit aucun symptôme après agroinfiltration quelle que soit la DO et la souche choisie (résultats non présentés). Sept jours après agroinfiltration, une nécrose a été observée au niveau du point d'infiltration. Au bout de 10 jours, les symptômes de jaunissement de la feuille commencent à apparaître. Il est à noter que les photos de l'expérience d'agroinfiltration ont été prises 10 jours après inoculation. Dans l'ensemble, il est observé que les quatre souches d'*Agrobacterium tumefaciens* provoquent un jaunissement sévère de la feuille à DO=1. Un grossissement des différents points d'infection pour le test agroinfection est donné à la **Figure 8C**. Pendant les 10 premiers jours après inoculation, aucun symptôme n'est observé sur les feuilles des plantes. Au bout de 15 jours après inoculation, des symptômes de nécroses commencent à apparaître au point d'infection avec le cure-

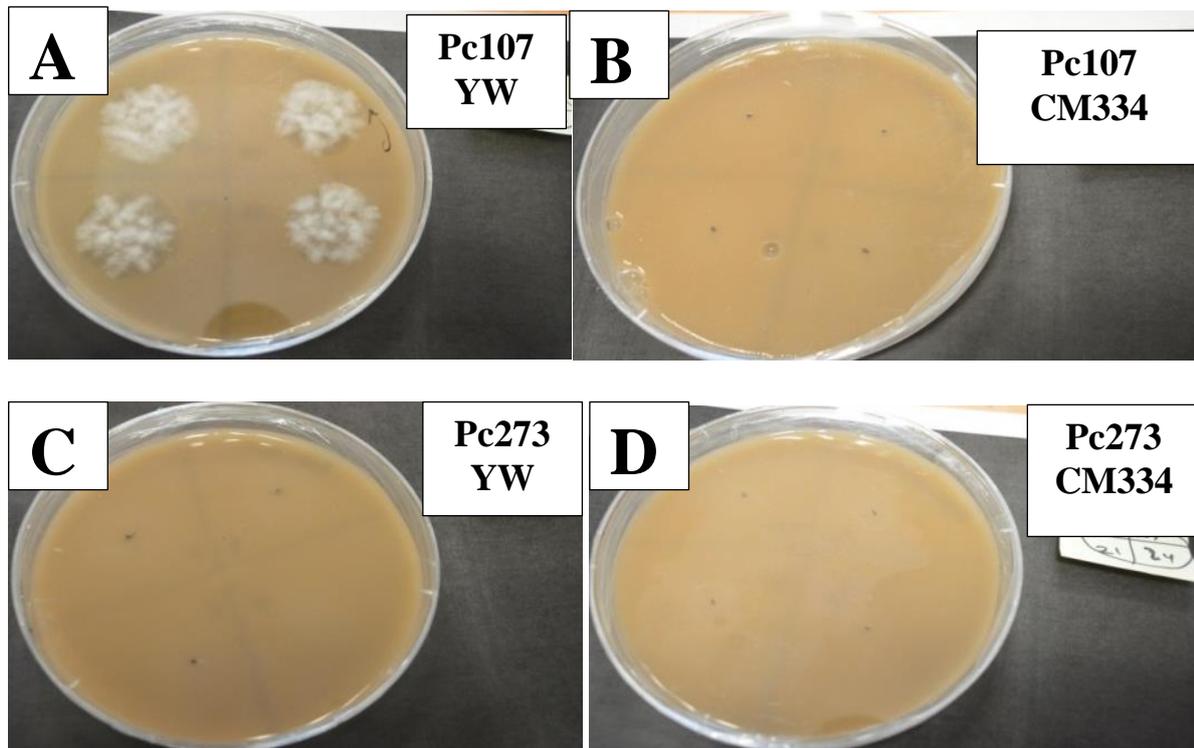


Figure 7 : Photo du suivie de croissance des isolats de *P. capsici* sur milieu V8 gélosé sélectif 3 jours après dépôts des tissus.

Des rondelles de tiges d'environ 1 mm ont été prélevées en dessous de la nécrose sur les tiges de piment pré-inoculées. A (Pc107-YW); B (Pc107-CM334); C (Pc273-YW); D (Pc273-CM334). Les rondelles sont déposées sur un milieu V8 gélosé contenant des antibiotiques (Ampicilline, Rifampicine, PcNb, Pimaricine, Vancomycine). Le test a été réalisé sur 4 plantes de chaque génotype. Les rondelles sont numérotées de 1 à 24 du côté le plus éloigné vers le côté le plus rapproché de la nécrose, soit 8 rondelles par plante. Les boîtes ont été photographiées trois jours après.

dent. Comme le montre la Figure 8C, la construction PVX:16240 présente l'expansion d'une réponse de la mort cellulaire au niveau du site ensemencé avec le cure-dent. Le Crinkler2 (CRN2) a été utilisé comme témoin positif et les constructions (PVX : GFP ; PVX : Δ GFP) comme témoins négatifs. Le CRN2 ne produit aucun symptôme sur les feuilles de piment, cependant des symptômes de CRN2 (nécroses) ont été observés sur des feuilles de *N. benthamiana* (résultats non présentés). En dehors de réponse mineure causée par la blessure lors de l'inoculation au cure-dent, aucune mort cellulaire n'est observée pour l'effecteur 9732#2 19 jours après infection.

Amplification par PCR des séquences RxLR pour le clonage Gateway

Nous avons opté pour la stratégie Gateway pour le clonage des effecteurs sélectionnés. Pour nous assurer de cloner nos gènes RxLR sans erreur, il a fallu choisir une polymérase sensible et très fidèle. De ce fait nous avons fait le choix de la Polymérase Herculase. Malgré le respect de tous les paramètres du protocole du fournisseur de cette enzyme nous n'avons pas amplifié les séquences RxLR avec la polymérase Herculase. Un test d'amplification par PCR a été réalisé avec une polymérase moins fidèle (GoTaq PROMEGA) que la Herculase. Avec la Taq PROMEGA, nous arrivons à amplifier la séquence de l'un des RxLR candidats avec la taille attendue pour plusieurs d'isolats de *P. capsici*. Les autres candidats ont montré une amplification non spécifique et ont présenté des bandes amplifiées de tailles différentes pour les différents isolats (résultats non présentés). D'autres polymérases sont en cours de test pour essayer d'amplifier les séquences RxLRs.

Discussion

Les gènes de ménage de *P. capsici* sont exprimés dans les échantillons de piment préalablement inoculés

Avant de procéder au clonage des effecteurs sélectionnés, il a été question de valider la présence de *P. capsici* dans nos matériels végétaux d'expérimentation. Les gènes de ménage codent pour des protéines essentielles aux fonctions cellulaires de base. L'expression de certains gènes de ménage de *P. capsici* dans l'interaction avec CM334 et YW pourrait confirmer la présence du pathogène. De ce fait l'expression des gènes de ménage de *P. capsici* (*Actine*, *Tubuline*) et de piment (*EF1 α*), contrôle) a été vérifiée par amplification par PCR. Les résultats obtenus montrent bien l'amplification par PCR des marqueurs de présence de *P. capsici* dans nos échantillons (CM334 et YW) (**Figure 5**). Une différence d'intensité de fragment amplifié a aussi été observée selon le temps de prélèvement d'échantillons d'ARN, le fond génétique du piment et le niveau d'agressivité de l'isolat de *P. capsici* (**Figure 5**). Au cours de ce test nous avons pu mettre en évidence de manière concomitante avec la caractérisation moléculaire du pathogène, l'induction de résistance de l'accession Criollo de Morelos 334 et aussi bien la sensibilité de YW. L'isolat Pc107 est beaucoup plus agressif sur YW que l'isolat Pc273. Les résultats montrent une augmentation de l'intensité du fragment de cDNA amplifié pour les gènes *Actine* et *Tubuline* à 72 hpi dans les échantillons de YW inoculés avec Pc107 et un effet inverse pour les échantillons de CM334 inoculés avec la même souche. Ceci suggère que le Pc107 a continué sa progression dans les tiges de l'accession sensible (YW) et sa progression est stoppée dans les tiges de l'accession résistante (CM334). Il s'avère que l'accession CM334 induit un mécanisme de résistance qui tend à réduire le développement du pathogène au niveau de la tige. Ces observations sont en parfaite adéquation avec les travaux réalisés sur la résistance du piment (Walker & Bosland, 1999; Candole, 2012).

Cinétique de progression des symptômes de *P. capsici* chez le piment

Phytophthora capsici est connu comme pathogène tellurique capable d'infecter le piment et provoquer des nécroses au niveau les différents organes de la plante (racines, tiges et feuilles). L'inoculation artificielle que nous avons réalisée sur les tiges de piment avec les deux isolats de *P. capsici* en condition contrôlée a permis de caractériser d'une part, le degré d'agressivité des deux isolats de *P. capsici*, et d'autre part, le niveau de résistance de nos deux accessions de piment. Ces résultats sont en adéquation avec les symptômes déjà décrits par des travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe d'accueil (communication personnelle). Ce test d'inoculation fait apparaître des similitudes dans la résistance des deux accessions de piment. Cette remarque est applicable pour YW variété sensible et CM334 variété résistante vis-à-vis de l'isolat Pc273. Des inversions de rang ont été observées, notamment avec l'isolat peu agressif Pc273 qui produit des nécroses plus importantes sur CM334 comparativement à l'accession YW (**Figure.2A**). Ce résultat obtenu est toutefois différent du résultat attendu, car l'isolat Pc273 est connu pour être un isolat de faible agressivité et l'accession CM334 pour être une variété plutôt résistante à *P. capsici*. Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution car trois jours après inoculation les plantes CM334 avaient un phénotype anormal, elles présentaient des symptômes ressemblant à des plantes virosées. Aucun test moléculaire n'a été réalisé pour confirmer si ces symptômes étaient dus à une infection virale. La présence d'un composé phyto-toxique dans la solution d'arrosage a été supposé bien qu'aucun symptôme similaire n'a été révélé sur les plantes de l'accession YW qui ont été soumis à la même condition de traitement que CM334. Il s'avère important de refaire le test pour confirmer si ces symptômes sont dus, soit à un problème de l'isolat Pc273 ou à un autre facteur. Les résultats obtenus sur les plantes inoculées avec l'isolat Pc107 montrent une progression de nécrose plus importante sur YW que CM334. La faible progression de longueur de nécrose dans les tiges de CM334 peut être expliquée par la mise en place d'un mécanisme de défense chez la plante qui tend à stopper le développement de *P. capsici*. Cela confirme la haute agressivité de l'isolat Pc107 par rapport à Pc273, ainsi que la résistance de l'accession CM334 par rapport à l'accession YW.

Expressions *in planta*

Les symptômes causés par l'interaction Agrobactérie-piment empêchent la mise en place de test d'expression transitoire par la méthode d'agroinfiltration.

En pathologie végétale, l'analyse fonctionnelle des gènes d'avrulence (*Avr*) et de résistance (*R*) reste un défi majeur. L'expression transitoire par agroinfiltration est une méthode qui utilise la capacité d'*Agrobacterium tumefaciens* à injecter de l'ADN porteur de gènes d'intérêt *in planta*. L'agroinfiltration est donc très utilisée pour relever ce défi par le criblage ainsi que la caractérisation moléculaire des interactions plantes-pathogènes (Bendahmane *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2012). Ce procédé fonctionne sur de nombreuses espèces de plantes dicotylédones qui comprennent les plantes modèles telles que : *Nicotiana benthamiana*, tomate et pomme de terre (Wroblewski *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2014). L'*Agrobacterium tumefaciens* étant un phytopathogène, des réponses de défense diverses peuvent être initiées chez la plante hôte. Nos résultats d'agroinfiltration montrent des symptômes de senescence foliaire sur les feuilles de piment, quel que soit la concentration de bactéries injectée. Il n'est pas possible de faire la différence entre le contrôle positif et le contrôle négatif, car il semblerait que *A. tumefaciens* induise des réponses non spécifiques. Ces résultats sont en adéquation avec les observations de (Wroblewski *et al.*, 2005). Les symptômes observés étaient généralisables à plusieurs souches d'agrobactérie dans le cadre de l'infiltration chez le piment. Causés par l'expression de cytokinines par certaines souches d'*A. tumefaciens* (Erickson *et al.*, 2014), le piment est donc plus sensible et réagit bien plus rapidement que *N. benthamiana*. Les souches classiques que nous avons testées étant dérivées principalement de la souche C58, d'autres souches provenant d'autre fonds génétique devraient être comparées (LBA4404 par exemple).

Les tests d'agroinfiltration présentent par ailleurs une reproductibilité très dépendante des conditions expérimentales. Les causes de variabilité des résultats sont multiples tels que : le génotype végétal utilisé et l'âge des feuilles de la plante agroinfiltrée perturbant l'injection de solution bactérienne dans la feuille, ainsi que les

conditions expérimentales de la chambre de culture perturbant la physiologie de la plante et perturbant la réponse de la plante lors de l'expression transitoire. Une meilleure connaissance de la biologie des ressources génétiques végétales utilisées, ainsi qu'un savoir-faire technique sont des compétences qui permettent de limiter ces problèmes, associés à une régulation optimale de l'environnement de culture (disposition des plantes, hygrométrie et température de chambre de culture).

L'utilisation de virus par agroinfection comme vecteur intermédiaire pour exprimer nos gènes d'intérêt est prometteuse

Une méthode alternative d'expression transitoire, fréquemment utilisée dans le cadre de criblage de ressources génétiques chez la pomme de terre (Huitema *et al.*, 2004; Vleeshouwers *et al.*, 2008), est l'expression de nos gènes RxLR par un virus PVX médiée par *A. tumefaciens* couramment appelée Agroinfection. Cette méthode est la technique disponible la plus facile pour tester une large gamme d'effecteurs *in planta*. Comparativement aux résultats de l'agroinfiltration, cette méthode fonctionne bien sur feuilles de piment, présentant des réactions de HR pour les contrôles positifs et une absence de symptôme pour les contrôles négatifs. Comme il est constaté à la (**Figure 8C**), de profil de réponse de type HR a été observé pour la construction PVX:16240. Ces résultats préliminaires sont très intéressants, car on arrive à produire une réaction de défense chez le piment avec un effecteur, ce qui démontre qu'on peut utiliser cette méthode pour exprimer nos effecteurs et tester leur reconnaissance par des facteurs de résistance chez les plantes criblées. Le gène CRN2 est connu comme un effecteur capable d'induire des nécroses chez les plantes (Torto *et al.*, 2003) ce qu'on a pu voir sur nos plantes témoins *N. benthamiana*, mais dans le cadre de notre test sur piment, il y a un début de symptôme nécrotique seulement au point d'infection au milieu de la feuille (**Figure 8C**). Il est probable que CRN2, reconnu par les mécanismes de défense chez *N. benthamiana* et la tomate, n'élicite pas ceux du piment. Le suivi de l'expression de gènes de défense comme les PR1 lors de l'agroinfection (par RT-qPCR par exemple) permettrait de répondre à cette interrogation.

Amplification des effecteurs RxLR

Le clonage pour l'expression in planta de gènes candidats nécessite d'amplifier les gènes cibles en limitant les risques d'incorporation d'un mauvais nucléotide par la Taq polymérase, pouvant conduire à un changement d'acide aminé. Pour cela, il a été décidé de choisir la polymérase Herculase (Herculase II Fusion DNA Polymerase) pour une amplification maximale de nos séquences effectrices candidates, avec un bon niveau de fidélité. Des difficultés ont été rencontrées dans la préparation du produit de PCR pour le clonage de nos gènes candidats. Plusieurs explications peuvent être à l'origine de ces difficultés rencontrées. L'annotation du génome de *P. capsici* n'est pas tout à fait parfaite, ce qui pourrait être la cause de la non-amplification de nos séquences. Parmi les RxLR sélectionnés, 2 d'entre eux n'avaient pas de codon stop, j'ai dû ré-annoter ces deux RxLR en vue de retrouver les codons stop des gènes en utilisant les scaffolds sur le site de JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/Phyca11/Phyca11.home.html>). Une autre explication peut se trouver dans la longueur de la queue attB ajoutée aux séquences des amorces du gène d'intérêt. La séquence attB ajoutée est presque deux fois plus longue que la séquence d'amorce spécifique du gène d'intérêt, d'autant que les extensions attB sont riches en GC, ce qui va automatiquement augmenter le risque d'avoir des structures en épingle à cheveux. Le succès d'une amplification par PCR est aussi sensible à l'ajustement de la température d'hybridation (T_m) lors de l'accrochage des amorces sur l'ADN matrice sans pour autant favoriser des amplifications aspécifiques. Il s'avère que la stratégie de clonage GATEWAY, via l'amplification des gènes cibles avec des queues attB et l'utilisation d'un vecteur d'entrée pDONR, est difficilement applicable sur des séquences d'ADN génomique de *P. capsici* ou du moins demande une compétence technique beaucoup plus développée. Je compte essayer une autre stratégie de clonage (Clonage TOPO®) dans un vecteur d'entrée pENTR. Cette stratégie va permettre d'affranchir l'étape d'ajout des extensions attB aux extrémités des amorces, il suffit de rajouter 4 bases sur une seule des deux amorces. Il faut souligner qu'avec la polymérase Taq PROMEGA, nous avons réussi à amplifier des bandes d'ADN pour certains des RxLRs candidats, avec les amorces comportant les queues attB.

Références bibliographiques

- Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC, 2000. Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: Application to the Rx2 locus in potato. *Plant Journal* **21**, 73–81.
- Blair JE, Coffey MD, Park SY, Geiser DM, Kang S, 2008. A multi-locus phylogeny for Phytophthora utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 266–277.
- Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S, 2012. Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 483–492.
- Candole BL, 2012. Evaluation of phytophthora root rot-resistant *Capsicum annuum* accessions for resistance to phytophthora foliar blight and phytophthora stem blight. *Agricultural Sciences* **03**, 732–737.
- Dodds PN, Rathjen JP, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.
- Dou D, Kale SD, Wang X *et al.*, 2008. RXLR-mediated entry of Phytophthora sojae effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *The Plant cell* **20**, 1930–47.
- Du J, Rietman H, Vleeshouwers VGAA, 2014. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and Nicotiana benthamiana. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e50971.
- Erickson JL, Ziegler J, Guevara D *et al.*, 2014. Agrobacterium-derived cytokinin influences plastid morphology and starch accumulation in Nicotiana benthamiana during transient assays. *BMC plant biology* **14**, 127.
- Fabro G, Steinbrenner J, Coates M *et al.*, 2011. Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen Hyaloperonospora arabidopsidis suppress host plant immunity. *PLoS pathogens* **7**, e1002348.
- Feng B-Z, Zhu X-P, Fu L *et al.*, 2014. Characterization of necrosis-inducing NLP proteins in Phytophthora capsici. *BMC Plant Biology* **14**, 126.
- Göker M, Voglmayr H, Riethmüller A, Oberwinkler F, 2007. How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 105–122.

- Greco M, Chiappetta A, Bruno L, Bitonti MB, 2012. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *Journal of Experimental Botany* **63**, 695–709.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC *et al.*, 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393–8.
- Hausbeck MK, Lamour KH, 2004. Research Progress and Management Challenges *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops : *Plant Disease* **88**.
- Hein I, Gilroy EM, Armstrong MR, Birch PRJ, 2009. The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Molecular Plant Pathology* **10**, 547–562.
- Hogenhout S a, Van der Hoorn R a L, Terauchi R, Kamoun S, 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **22**, 115–122.
- Huitema E, Bos JIB, Tian M, Win J, Waugh ME, Kamoun S, 2004. Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*-plant interactions. *Trends in Microbiology* **12**, 193–200.
- Jiang RHY, Tyler BM, 2012. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annual review of phytopathology* **50**, 295–318.
- Jones JDG, Dangl JL, 2006a. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jones JDG, Dangl JL, 2006b. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–9.
- Jupe J, Stam R, Howden AJ *et al.*, 2013. *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome biology* **14**, R63.
- Kamoun S, 2003. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**, 191–199.
- Kamoun S, 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual review of phytopathology* **44**, 41–60.
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG *et al.*, 2014. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **16**, 413–34.
- Lamour K, Kamoun S, 2008. Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools. *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools*, 1–574.
- Lamour KH, Stam R, Jupe J, Huitema E, 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* **13**, 329–337.

- Mallard S, Cantet M, Massire A, Bachellez A, Ewert S, Lefebvre V, 2013. A key QTL cluster is conserved among accessions and exhibits broad-spectrum resistance to *Phytophthora capsici*: A valuable locus for pepper breeding. *Molecular Breeding* **32**, 349–364.
- Oh S-K, Young C, Lee M *et al.*, 2009. In Planta Expression Screens of *Phytophthora infestans* RXLR Effectors Reveal Diverse Phenotypes, Including Activation of the *Solanum bulbocastanum* Disease Resistance Protein Rpi-blb2. *the Plant Cell Online* **21**, 2928–2947.
- Pain A, Hertz-Fowler C, 2010. Plant killers on the spot. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 615.
- Perfect SE, Green JR, 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* **2**, 101–108.
- Rajput NA, Zhang M, Shen D *et al.*, 2015. Overexpression of a *Phytophthora* Cytoplasmic CRN Effector Confers Resistance to Disease, Salinity and Drought in *Nicotiana benthamiana*. *Plant and Cell Physiology* **56**, 2423–2435.
- Rietman H, 2010. Plants and oomycetes, an intimate relationship: co-evolutionary principles and impact on agricultural practice. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **5**.
- Rizzo DM, Garbelotto M, Hansen EM, 2005. *Phytophthora ramorum*: integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon forests. *Annual review of phytopathology* **43**, 309–35.
- Stam R, Howden AJM, Delgado-Cerezo M *et al.*, 2013a. Characterization of cell death inducing *Phytophthora capsici* CRN effectors suggests diverse activities in the host nucleus. *Frontiers in plant science* **4**, 387.
- Stam R, Jupe J, Howden AJM *et al.*, 2013b. Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PloS one* **8**.
- Thabuis a, Palloix A, Pflieger S, Daubèze A-M, Caranta C, Lefebvre V, 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 1473–85.
- Torto T a, Li S, Styer A *et al.*, 2003. EST Mining and Functional Expression Assays Identify Extracellular Effector Proteins From the Plant Pathogen *Phytophthora*

- EST Mining and Functional Expression Assays Identify Extracellular Effector Proteins From the Plant Pathogen *Phytophthora*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1675–1685.
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X *et al.*, 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 1261–6.
- Vincent D, Tan K, Cassidy L, Solomon PS, Oliver RP, 2012. Plant Fungal Pathogens. *Human Press* **835**, 75–96.
- Vleeshouwers VGAA, Oliver RP, 2014. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 196–206.
- Vleeshouwers VGAA, Rietman H, Krenek P *et al.*, 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and *Phytophthora Infestans* Avirulence Genes. *PLoS ONE* **3**, e2875.
- Walker SJ, Bosland PW, 1999. Inheritance of *Phytophthora* Root Rot and Foliar Blight Resistance in Pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**, 14–18.
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L *et al.*, 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**, 115–118.
- Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R, 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 259–273.