

Communications Orales

O-1 TMV AS A MODEL FOR THE ANALYSIS OF NUCLEIC ACID TARGETING TO PLASMODESMATA

JAMIE ASHBY, VITALY BOYKO, EMMANUEL BOUTANT, ANNA GRONER, MONIKA FASLER, MARK SEEMANPILLAI, CHRISTOPHE RITZENTHALER, AND MANFRED HEINLEIN

12, rue du Général Zimmer 67084 STRASBOURG, FRANCE

Studies in higher plants have revealed the existence of RNA species that travel cell-to-cell and through the vasculature to serve as signaling molecules in plant development and gene silencing. RNA viruses encode movement proteins to interact with the RNA transport machinery and to spread their genomes from cell-to-cell. The MP of Tobacco mosaic virus (TMV) is believed to form a ribonucleoprotein complex (RNP) with viral RNA (vRNA) and to represent the core of the infectious particle that spreads between cells. This hypothesis is supported by the ability of MP to bind single-stranded nucleic acids *in vitro*, by its localization to plasmodesmata (Pd), its interaction with cell wall proteins, as well as by its ability to modify the size exclusion limit (SEL) of Pd. Our research is aimed at elucidating whether the MP indeed forms an RNP *in vivo*, and also at understanding the cellular mechanism that targets the viral RNA genome (e.g. the RNP) to Pd. Previous studies in our laboratory indicated that the movement process is correlated with the ability of the MP to interact with microtubules (MT). The interaction of MP:GFP with MT is most prominently seen in cells undergoing later stages of infection. However, since cell-to-cell spread of infection occurs within shorter time, we consider it unlikely that the MP:GFP-tagged MT represents the active transport complex. The complexes are indeed unusually stable, which appears to be inconsistent with a dynamic process of movement. However, in cells at the leading front of infection, we found that MP:GFP also localizes to mobile particles that move along filaments, presumably MT. Similar particles are observed if viral RNA is labeled with GFP, suggesting that they may represent vRNPs. We suggest a two-step process in which MP first supports forward trafficking through association with vRNA and then blocks further MT-mediated transport processes through the formation of stabilized MT complexes.

O-2 LE CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS DÉVELOPPE DES CORPS D'INCLUSION SPÉCIALISÉS ET OBLIGATOIRES POUR LA TRANSMISSION PAR VECTEUR

MOUNIA KHELIFA, KALPANA KRISHNAN, SANDRA JOURNOU, DANIEL GARGANI, STÉPHANE BLANC ET MARTIN DRUCKER

CIRAD-INRA-ENSAM, Bat. TA41/K Campus International de Baillarguet 34398 MONTPELLIER CEDEX, FRANCE

Pour que le Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) puisse être transmis par pucerons, un complexe de transmission, composé de virions et de deux protéines virales, P2 et P3, doit se former. Dans la cellule végétale infectée, les composants du complexe transmissible sont repartis de manière inégale, avec la totalité de P2 et quelques complexes P3:virions dans les corps d'inclusion clairs (eIIB), et la vaste majorité des complexes P3:virions dans les corps d'inclusion denses (edIB), où P2 est totalement absente. Cette séparation spatiale des composants du complexe transmissible favorise l'acquisition séquentielle de P2 (dans les eIIB) et P3:virions (dans les edIB) par le vecteur. Il existe certaines souches de CaMV qui ne sont pas transmissibles, alors qu'elles expriment P2. Ces souches ont en commun une mutation ponctuelle dans P2, qui change la glycine en position AA 94 en arginine (P2-94), à laquelle a été attribuée la perte de transmissibilité. Paradoxalement, P2-94 est parfaitement fonctionnelle quand elle est exprimée *in vitro*. La question se pose alors : Pourquoi est-ce que P2-94 abolie la transmission du CaMV *in vivo*? Nous avons cherché répondre à cette question et construit un mutant du CaMV (BJI-94) qui ne porte que cette mutation par rapport à une souche transmissible sauvage (BJI). Nous avons aussi produit les deux protéines (P2 et P2-94) dans un système hétérologue. Une comparaison des deux protéines recombinantes n'a révélé aucune différence, ni au niveau de la fonctionnalité dans des tests de transmission artificiels, ni au niveau de la stabilité de la protéine. Pourtant, le mutant CaMV BJI-94 s'est confirmé non-transmissible de plante à plante par pucerons. La P2 mutée s'accumule moins dans les plantes infectées par le CaMV BJI-94 que par le CaMV sauvage, mais elle y est pourtant suffisamment présente pour que la transmission soit théoriquement possible. Par microscopie électronique sur des feuilles infectées avec le CaMV BJI-94, nous avons montré que les cellules infectées contiennent des edIB, mais pas d'eIIB, qui sont les structures où s'accumule la totalité de P2 dans le cas du CaMV sauvage. En cherchant la localisation alternative de P2-94 dans ces plantes infectées par le CaMV BJI-94, nous avons découvert des paracrystaux, qui représentent une forme insoluble de P2, précédemment décrite *in vitro* mais jamais dans des plantes infectées. Ce résultat démontre que dans des cellules infectées, la présence des composants du complexe transmissible P2, P3 et virions ne suffit pas, même si chacun est fonctionnel. Ces composants, et en particulier P2, doivent obligatoirement être localisés dans des structures spécialisées pour permettre la transmission. Actuellement nous essayons de déterminer pourquoi P2-94 ne s'accumule plus dans les eIIB et les premières hypothèses et/ou résultats seront présentés.

O-3 TERPENOÏD DERIVED MOLECULES TRIGGER THE PRESYMBIOTIC STAGE OF AM FUNGI

ARNAUD BESSERER, CHRISTOPHE ROUX, GUILLAUME BECARD AND NATHALIE SEJALON-DELMAS

UMR CNRS-UPS, 31326 CASTANET TOLOSAN, FRANCE

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are symbiotic organisms which show an obligatory biotrophic behavior. In the absence of plant host, germination of spores may occur but metabolic fungal cell activity and hyphal growth are limited. In the presence of a host plant, a typical intense branching of germinative hyphae is observed. It has been hypothesized that, similarly to the flavonoid signal in Legume/ *Rhizobium* symbiosis, a plant signal here also activates a symbiotic genetic program in the microbial partner. A semi-purified fraction of *Daucus carota* root exudates was obtained in previous studies (1). In the absence of host roots, this fraction of root exudates induces intense branching of hyphae, mimicking the response observed when the fungus grows in the presence of host roots. This intense hyphal branching seems to be the visible consequence of an activated respiration rate and metabolic awakening (2). We have isolated a terpenoid derived molecule whose activity on the fungus is similar to this of the root exudates fraction. Respiratory activity of several AM fungi treated with this molecule is increased thirty minutes after treatment, i.e. several hours prior to hyphal branching induction. At the cytological level, one hour after treatment, mitochondria of *Gigaspora rosea* stained with the MitoTrackerGreen FM dye (Molecular Probes) display a new morphology (rod shape) and their number increases. To further investigate this mitochondrial response, immunolabelling of COX1 and PORIN was carried out. These two genes are involved in cell respiration. The first is involved in cell respiration and the second one code for a structural transmembrane protein. Higher labelling of COX 1 and PORIN was observed in hyphae one and five hours after treatment with the active molecule comparing with the control. Our preliminary results suggest that the fungal mitochondria are an important target of an early plant-fungus signalling in the AM symbiosis.

(1) Buée, M., M. Rossignol, A. Jauneau, R. Ranjeva G. Becard, The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates, *Molecular Plant Microbe Interactions* 13 (2000) 693-698 (2)

(2) Tamasloukht, M., N. Sejalon-Delmas, A. Kluever, A. Jauneau, C. Roux, G. Bécard, P. Franken, Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*, *Plant Physiol* 131 (2003) 1468-1478

O-4 CYTOSKELETAL REORGANIZATION PRECEDING ENDO-MYCORRHIZAL FUNGAL INFECTION OF *MEDICAGO TRUNCATULA*

M. CHABAUD, A. GENRE, A.C.J. TIMMERS, P. BONFANTE AND D.G. BARKER

LIPM, UMR CNRS-INRA, chemin de borde rouge BP52627, 31326 CASTANET TOLOSAN, FRANCE

Arbuscular endomycorrhizal (AM) fungi enter the plant root and establish an endosymbiotic association with the host providing essential nutrients such as phosphate, and in return receiving energy supplies which is indispensable for their growth and multiplication. We are studying cellular processes involved in the establishment of the association between the legume *Medicago truncatula* and AM fungi. As an experimental model for these studies we are using A. rhizogenes-transformed root cultures in conjunction with a targeted inoculation approach based on the negative geotropism of germinating hyphae of *Gigaspora* spp. (Chabaud et al. 2002). By introducing fluorescent GFP-markers labelling the plant cytoskeleton and the ER we have been able to monitor in vivo the cellular mobilisation of the root epidermis during initial AM contact and penetration. These studies have revealed a novel plant intracellular structure, formed prior to fungal penetration into the epidermal cell, that we have baptised the Pre-Penetration Apparatus (PPA). Real time observations using confocal microscopy suggest that the AM-elicited PPA is directly responsible for elaborating the membrane tunnel through which the fungus grows as it penetrates the cell lumen. The discovery of this complex and highly coordinated cellular process shows clearly for the first time that the plant controls and directs early stages of endomycorrhizal fungal infection. Comparable studies are underway with the *dmi2* and *dmi3* *M. truncatula* Myc- mutants, which are blocked at the appressorium stage and also defective in rhizobial Nod factor signal transduction (Catoira et al. 2000). The results from these experiments will be discussed in the context of symbiotic plant-fungal signalling.

Chabaud *et al.* 2002. *New Phytol.* 156: 265-273.

Catoira *et al.* 2000. *Plant Cell* 12 : 1647-1665.

O-5 INVESTIGATING THE MOLECULAR GENETICS OF PLANT INFECTION BY THE RICE BLAST FUNGUS *MAGNAPORTHE GRISEA*

NICHOLAS J. TALBOT, MARTIN J. GILBERT, DARREN M. SOANES, ZHENG YI WANG, CLAIRE VENEULT-FOURREY, JOANNA M. JENKINSON, RICHARD A. WILSON, LUCY J. HOLCOMBE, AND GURPREET BHAMBRA.

School of Biological Sciences, University of Exeter, Washington Singer Laboratories, Perry Road, Exeter, EX4 4QG, UK

The rice blast fungus *Magnaporthe grisea* causes one of the most serious diseases of cultivated rice, and understanding the early events of the infection is of paramount importance if durable control measures are to be developed. *M. grisea* forms a specialised infection structure called an appressorium which is used to penetrate the tough outer cuticle of rice leaves, allowing the fungus entry to the underlying tissues (Talbot, 2003). Appressoria are melanin-pigmented, dome shaped cells, which form in response to the hydrophobic leaf surface and generate massive turgor pressure. We are using a multi-disciplinary approach, involving gene functional analysis, cell biology and analytical biochemistry, to investigate the biology of appressorium-mediated plant infection. In the course of these studies we have identified a number of key determinants of appressorium morphogenesis and function.

Appressorium turgor is generated by accumulation of a compatible solute within the appressoria to very high concentrations. We have been examining the role of trehalose, glycogen and lipids as sources for glycerol biosynthesis in the appressorium (Foster et al., 2003; Wang et al., 2003) and progress in the analysis of glycerol biosynthetic pathways and their genetic regulation will be presented. Additionally, we have been exploring the function of a novel class of P-type ATPases in the regulation of secretion during appressorium-mediated infection, and the genetic control of the early events of infection structure formation. Progress in developing an understanding of the genetic determinants required for appressorium-mediated infection by *M. grisea* will be presented.

Foster, A.J., Jenkinson, J.M., Talbot, N.J. (2003) Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J.* 22: 225-235.

Wang, Z.Y., Thornton, C.R., Kershaw, M.J., Debaio, L. and Talbot, N.J. (2003) The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology* 47: 1601-12

Talbot, N.J. (2003) On the trail of a cereal killer: investigating the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* 57: 177-202

O-6 RÔLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LA FONCTIONNALITÉ DES APPRESSORIA CHEZ COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM

RICHARD LAUGÉ, EUGÉNIE CHAROIN-BARD, ET THIERRY LANGIN

IBP, Université Paris-Sud, 91405 ORSAY, FRANCE

Colletotrichum lindemuthianum, champignon ascomycète, est responsable de l'anthracnose du haricot commun. Il attaque l'ensemble des parties aériennes de la plante, en provoquant, en fin de cycle, la nécrose des tissus infectés. L'analyse phénotypique d'une collection de mutants non pathogènes, obtenus par mutagenèse insertionnelle, avait permis d'identifier le mutant H290 : ce mutant bien que différenciant des appressoria matures est incapable de pénétrer les tissus végétaux. Son développement saprophytique est normal. L'analyse moléculaire du mutant H290 a permis d'identifier le gène *clk1* (Dufresne et al., MPMI (1998), 11, 99-108), codant une Sérine/Thréonine kinase. *clk1* est l'orthologue du gène *atg1*, codant une kinase gouvernant l'entrée en autophagie de *Saccharomyces cerevisiae* en condition de carence nutritionnelle. L'homologie fonctionnelle entre *clk1* et *atg1* a été démontrée par complémentation de mutants de levure. Pour cela, l'orthologue du gène *atg8* (*clapg2* pour *C. lindemuthianum* autophagie-2) impliqué dans la formation des autophagosomes chez *S. cerevisiae*, a été cloné chez *C. lindemuthianum*. In vitro, le gène *clapg2* est induit en conditions de carence nutritionnelle. En condition d'infection, ce gène est induit de façon transitoire au cours du développement des appressoria. L'ensemble de ces résultats suggèrent une implication du processus d'autophagie dans la mobilisation des ressources nécessaires à la fonctionnalité des appressoria. De façon à valider cette hypothèse, des mutants nul (*clapg2::hph*) ont été construits par remplacement de gène dont l'analyse phénotypique est en cours.

O-7 ANALYSE FONCTIONNELLE DE CLSTE12, UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION ESSENTIEL POUR LE POUVOIR PATHOGÈNE DE *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM*, AGENT RESPONSABLE DE L'ANTHRACNOSE DU HARICOT

WONG SAK HOI J., HERBERT C., DUMAS B.

UMR CNRS-UPS, 24 chemin de Borde Rouge, 31326 CASTANET TOLOSAN, FRANCE

Le facteur de transcription STE12 de levure est impliqué dans la régulation de la reproduction sexuée et la croissance invasive. L'activité de ce facteur est dépendante d'une voie MAPKinase impliquant notamment la MAPKinase KSS1. Chez plusieurs champignons parasites de plantes, des orthologues de KSS1 sont essentiels dans le pouvoir pathogène, suggérant un rôle des facteurs de type STE12 pour l'établissement de l'infection. Pour tester cette hypothèse, nous avons isolé un gène de type STE12 (CLSTE12) chez *Colletotrichum lindemuthianum*, l'agent fongique responsable de l'antracnose du haricot. Ce gène code une protéine de 705 acides aminés, comprenant un homéodomaine dans la région N-terminale et deux doigts de zinc de type Cys2His2 dans la région C-terminale. L'homéodomaine est présent chez tous les membres de la famille STE12 identifiés jusqu'à présent, alors que les doigts de zinc sont spécifiques des champignons filamenteux. Nous avons produit des versions tronquées de la protéine dans *Escherichia coli* avec deux, un ou aucun doigt de zinc. Des expériences de gel retard ont montré la capacité de la protéine à se fixer à la séquence consensus de levure malgré les délétions, ce qui indique que les doigts de zinc ne sont pas essentiels à la liaison à l'ADN. Afin de déterminer la fonction de CLSTE12, des disruptants *clste12* ont été obtenus par recombinaison homologue. Aucune différence dans la croissance saprophytique n'a été observée avec la souche sauvage. En revanche, ces mutants ne sont plus capables d'induire des lésions d'antracnose sur les feuilles de haricot, indiquant un rôle essentiel pour CLSTE12 dans le pouvoir pathogène de *C. lindemuthianum*.

O-8 METABOLISME SECONDAIRE ET AVIRULENCE CHEZ *MAGNAPORTHE GRISEA*

JÉRÔME COLLEMARE, HEIDI U. BÖHNERT, MIKAËL PIANFETTI, ISABELLE FUDAL, DIDIER THARREAU ET MARC-HENRI LEBRUN

Bayer Crop Science-CNRS, 14-20 rue Pierre Baizet, 69009 LYON, FRANCE

Les interactions entre les cultivars de riz résistants et le champignon ascomycète responsable de la pyriculariose, *Magnaporthe grisea*, sont souvent contrôlées par des relations gène-pour-gène. Ainsi, la souche avirulente Guy11 possède le gène d'avirulence ACE1 qui contrôle la production d'un signal spécifiquement reconnu par les cultivars de riz possédant le gène de résistance du riz Pi33. ACE1 code pour une enzyme du métabolisme secondaire correspondant à la fusion entre une polycétide synthase et une peptide synthétase non ribosomale. Le gène ACE1 est exprimé spécifiquement au niveau des appressoria lors de la pénétration du champignon dans la plante hôte et l'enzyme Ace1 est localisée dans le cytoplasme de l'appressorium. L'étude du promoteur d'ACE1 nous a permis d'identifier une région de 102pb essentielle à son expression appressoriale qui contient un motif putatif de fixation de facteur de transcription à doigts de zinc. Une mutagenèse dirigée dans ce motif est en cours afin de valider cette hypothèse. L'allèle d'ACE1, Ace1-ks0, construit par mutagenèse dirigée d'un acide aminé essentiel du domaine KS de la polycétide synthétase, conduit à une protéine Ace1-ks0 sans activité enzymatique qui est incapable de conférer l'avirulence. Ce résultat suggère que le signal d'avirulence reconnu par la plante résistante n'est pas la protéine correspondant Ace1, mais le métabolite secondaire dont la biosynthèse dépend d'ACE1. Afin de caractériser ce métabolite, nous avons développé des analyses de profils métaboliques par LC-MS-MS soit d'appressoria d'isolats virulent et avirulents de *M. grisea* différenciés sur des épidermes d'oignon, soit de tissus mycéliens exprimant constitutivement ACE1. Le locus ACE1 comporte 15 gènes regroupés dans une région de 70kb qui codent pour des protéines caractéristiques des voies de biosynthèse de métabolites secondaires, notamment deux énoyl-réductases, un transporteur de type MFS et un facteur de transcription putatif à doigts de zinc. Nous avons montré par RT-PCR quantitative que tous ces gènes ont un profil d'expression spécifique de la pénétration dans la plante identique à celui qu'ACE1, montrant ainsi que ces 15 gènes appartiennent à un cluster de gènes co-exprimés. L'analyse fonctionnelle de ces gènes est en cours (inactivation ciblée) afin de déterminer si certains sont impliqués dans la biosynthèse du signal d'avirulence reconnu par les cultivars de riz portant Pi33.

O-9 REGROUPEMENT DE GÈNES DE PATHOGÉNIE ET D'AVIRULENCE DANS UN CIMETIERE DE TRANSPOSONS CHEZ *LEPTOSPHAERIA MACULANS*

ISABELLE FUDAL, SIMON ROSS, LILIAN GOUT, MARIE-LINE KUHN, LAURENCE CATTOLICO, MARIE-HÉLÈNE BALESSENT ET THIERRY ROUXEL

INRA, route de Saint Cyr, 78026 VERSAILLES,

Huit gènes d'avirulence (*AvrLm1* à *AvrLm8*) ont été génétiquement identifiés chez le champignon responsable de la nécrose du collet du colza, *Leptosphaeria maculans*, et localisés dans quatre régions distinctes du génome de ce champignon. Les gènes d'avirulence *AvrLm1*, *AvrLm2* et *AvrLm6* sont génétiquement regroupés en un cluster de gènes d'avirulence, couvrant une distance génétique de 8.1 cM. Nous avons identifié un contig de clones BACs d'une taille de 1Mb correspondant à cette région. Ce contig a été entièrement séquencé chez un isolat avirulent pour *AvrLm1* et *AvrLm6* et virulent pour *AvrLm2*. Certaines régions riches en G+C ont également été séquencées chez deux autres isolats virulents ou avirulents pour *AvrLm1*, *AvrLm2* et *AvrLm6*. Nous avons ainsi pu étudier l'organisation et le polymorphisme de la région génomique chez ces différents isolats. Cette région génomique est globalement riche en A+T et fortement déficiente en événements de recombinaison. Elle est caractérisée par des îlots de 10 à 30 kb équilibrés en G+C et contenant des ORFs, séparés par de grandes régions contenant des mosaïques d'éléments répétés dégénérés par des événements de type RIP. Les régions riches en G+C sont bien conservées entre isolats. Les gènes identifiés dans ces régions riches en G+C sont exprimés pendant l'infection et codent pour des protéines pouvant être impliquées dans le métabolisme secondaire, pour des transporteurs ou pour des protéines sécrétées de petite taille (dont une protéine riche en cystéine). Quelques gènes ont également été identifiés dans les régions riches en A+T. Ces gènes sont exprimés dans des spores cultivées en milieu minimum et codent pour de petites protéines sécrétées. Plusieurs gènes de la région pourraient intervenir dans des interactions plante / microorganisme, en particulier ceux codant pour un facteur de nodulation, des enzymes du métabolisme secondaire et des protéines sécrétées. La détermination de gènes candidats pour *AvrLm1*, *AvrLm2* et *AvrLm6* sera discutée.

O-10 SÉQUENÇAGE DU GÉNOME DU CHAMPIGNON PATHOGÈNE *BOTRYTIS CINEREA* - ETAT DES LIEUX

SABINE FILLINGER, MURIEL VIAUD, CAROLINE LEVIS, JEAN-MARC PRADIER, ELISABETH FOURNIER, JOËLLE AMSELEM ET MARC-HENRI LEBRUN

INRA, Route de Saint-Cyr 78026 VERSAILLES CEDEX, FRANCE

Le projet de séquençage du génome du champignon pathogène de la vigne *Botrytis cinerea* s'inscrit dans le cadre d'une analyse moléculaire de l'écosystème " vigne et ses pathogènes " incluant le phytoplasme Stolbur. La caractérisation des génomes de la vigne et de ses principaux agents pathogènes (*B. cinerea*, Stolbur) offre l'opportunité d'étudier les mécanismes impliqués dans les interactions entre la vigne et ses pathogènes ainsi que dans la dynamique de ces pathogènes dans l'écosystème " vigne ". *B. cinerea* est un champignon haploïde, de la classe des Leotiomycètes, dont le génome a une taille de 30 Mb. C'est une espèce modèle pour l'étude du processus infectieux des champignons phytopathogènes nécrotrophes. Un réseau d'équipes publiques françaises travaillant sur *B. cinerea* soutenu par un consortium international a demandé le séquençage complet (10X) du génome de ce champignon au Génoscope à l'appel d'offre 2004. Le séquençage en " shotgun " sera réalisé à partir de banques génomiques qui seront construites au Génoscope à partir d'ADN génomique purifié, sans ADN mitochondrial. L'existence de collections de séquences d'extrémités de BAC de *B. cinerea* sera mise à profit pour l'assemblage des séquences en super-contigs. La construction d'une carte génétique sera réalisée à partir des microsatellites identifiés dans le génome afin d'assigner chaque super-contig à un chromosome. L'annotation automatique sera réalisée par plusieurs approches; comparaison des gènes putatifs de *B. cinerea* à ceux des banques de séquences, en particulier les protéines issues de l'analyse des génomes fongiques, ensuite par une prédiction de gènes ab initio (les programmes de prédiction de gènes existant seront adaptés à cet organisme en incluant un apprentissage des algorithmes de détection des introns en utilisant des séquences d'EST ou d'ADNc pleine longueur disponibles ou générées par le projet). Enfin, les gènes putatifs de *B. cinerea* seront comparés systématiquement avec ceux du champignon phylogénétiquement apparenté *Sclerotinia sclerotiorum*, dont le séquençage devrait être initié aux USA en 2005. L'annotation automatique sera vérifiée, validée ou corrigée par une annotation manuelle réalisée par des groupes d'experts issus d'un consortium international regroupant 25 laboratoires (15-20 personnes/an).

O-11 MISE EN PLACE DE RESSOURCES DE GÉNOMIQUE CHEZ *APHANOMYCES EUTEICHES*, OOMYCÈTE PARASITE DE LÉGUMINEUSES

E. GAULIN, C. JACQUET, S. TERRAS, A. BOTTIN, ET B. DUMAS

UMR CNRS-UPS, 24 Chemin de Borde Rouge, BP17, 31326 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

Les Oomycètes ont longtemps été classés parmi les champignons, mais ils en sont éloignés phylogénétiquement et se rapprochent des diatomées et algues brunes. De par leur position taxonomique et leurs propriétés biologiques, les mécanismes du pouvoir pathogène des oomycètes ne peuvent être déduits directement de ceux des champignons filamenteux Fungi, et sont mal connus. Le séquençage des génomes des Oomycètes est freiné par leur grande taille, variant entre 80 et 240 Mb, et n'est assuré que pour le genre *Phytophthora*. Le genre *Aphanomyces*, occupe une position originale au sein des Oomycètes, car il est le seul genre qui comprend des espèces responsables de maladies affectant soit des végétaux soit des animaux. *Aphanomyces euteiches* est un parasite majeur de différentes légumineuses dont le pois fourrager, la luzerne, le trèfle. De plus, la capacité d' *A. euteiches* d'infecter la légumineuse modèle *Medicago truncatula* renforce l'intérêt d'utilisation de ce microorganisme pour l'étude des interactions plantes-parasites. Malgré cet intérêt, le nombre de séquences d' *Aphanomyces* actuellement répertoriées dans GenBank est très faible et ne concerne que des séquences ribosomales ou mitochondriales. Afin de pallier cette carence environ 900 ADNc du microorganisme cultivé en condition saprophyte ont été séquencés, ceci permettant d'identifier des gènes candidats potentiellement impliqués dans le pouvoir pathogène. Ces premiers résultats illustrent en outre l'originalité d' *Aphanomyces*, puisqu'environ 50% des séquences n'ont aucun homologue chez les Oomycètes. Ces données vont être amplifiées par une collaboration avec le Génoscope visant à séquencer environ 20 000 ADNc d' *A. euteiches* cultivé en condition de croissance saprophyte et en condition de contact avec la plante hôte. L'état d'avancement de ce projet sera présenté.

O-12 PLANTS VERSUS BACTERIA: THE FUNCTIONAL GENOMICS OF ATTACK AND DEFENCE

JOHN MANSFIELD, MARTA DE TORRES, NINA GRABOV, ROB JACKSON

Imperial College London, Wye Campus, Ashford, Kent UK

Results from studies of interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) and its host *Phaseolus* bean, and also the non-host *Arabidopsis thaliana* will be discussed. Our findings support the following conclusions about plant-bacterium interactions.

Plants possess a basal resistance to challenge by non-pathogenic microbes. This level of resistance is activated by common bacterial surface features, such as lipopolysaccharides and components of the flagellum, and has strong similarities to systems of innate immunity in man and invertebrates. Restriction of microbial colonisation at the basal level is associated with localised alterations to the plant cell wall, including incorporation of phenolics and deposition of callose. The compounds that directly restrict multiplication of non-pathogens have not, however, been fully characterised. Pathogens overcome basal defence by the injection of effector proteins into plant cells through the type III secretion system which utilises an injection apparatus (the Hrp pilus) which traverses the plant cell wall. Large families of effectors have been identified through genomic mining of sequenced pathogens. Effectors are able to suppress basal defences. There is a constant battle between effectors and induced resistance. For example, in *Arabidopsis*, the effector AvrPtoB is unable to overcome the resistance activated by flagellin but does suppress other defences in the absence of the flagellin receptor FLS2. By studying variation in basal resistance amongst different accessions of *Arabidopsis* it has been possible to demonstrate the presence of several genes for basal resistance in addition to *FLS2*.

A second level of plant resistance has evolved through the ability of plants to recognise and react to effectors. Recognition of effectors is based on the presence of the proteins encoded by resistance (*R*) genes. The direct or indirect interaction between resistance and effector gene products leads to the hypersensitive resistance reaction (HR). Effector genes were first identified by their role in the induction of the HR and designated avirulence (*avr*) genes. Because of the diversity of effector proteins produced, the loss of one does not usually lead to a loss in pathogenicity. It is easier to demonstrate the dramatic, HR-inducing, *avr* function than the more subtle virulence effects conditioned by a single effector. In *Pph*, loss of plasmids carrying numerous effector genes has facilitated the identification of virulence factors, and dual function has been shown for *virPphA*, *avrPphF* and *avrPphC*. Paradoxically, loss of an effector which also acts as an *avr* gene may lead to an increase in virulence towards previously resistant varieties. The race-change phenomenon makes diseases difficult to control through the use of major genes.

The loss of effector or *avr* function can occur through point mutation or the deletion of genes and chromosomal segments. Loss of the *avrPphB* and *avrPphF* genes from the bean pathogen *Pph* is through 10.5kb and 106kb deletions respectively. The excised *avrPphB*-containing fragment has been shown to circularise into an episome which may be transferred between conjugating bacteria. Genome analysis in some strains that have lost *avrPphF* has shown that the deletion generates a new open reading frame which encodes an effector which may replace the virulence function of *avrPphF*. The mixing and generation of new effector proteins seems to allow basic pathogenicity to be retained. The mobility of the clusters of genes surrounding effectors may have driven the evolution of new pathogens and pathotypes.

O-13 APPROCHE INTÉGRÉE DE LA PATHOGÉNIE DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* : DU GÉNOME BACTÉRIEN À LA PLANTE

N. PEETERS, A. ANGOT, P. BARBERIS, P. BOISTARD, S. CUNNAC, S. GENIN, A. OCCHIALINI, M. VALLS ET C. BOUCHER.

LIPM, UMR CNRS-INRA, BP 52627, 31326 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

Chez les bactéries phytopathogènes à Gram négatif les gènes *hrp* sont des déterminants majeurs indispensables à l'établissement de la relation parasitaire. Ces gènes codent pour un système de sécrétion de protéines qui permet l'injection dans la cellule végétale de protéines bactériennes, dites effecteurs qui sont les déterminants directs de la maladie. L'analyse de la séquence du génome de *Ralstonia solanacearum* nous a permis d'identifier le répertoire de la centaine d'effecteurs produits par cette bactérie. Notre laboratoire vise à la caractérisation des effets physiologiques des effecteurs sur la cellule végétale ainsi qu'à la recherche des cibles moléculaires correspondantes chez la plante en utilisant *Arabidopsis thaliana* comme plante hôte. L'aptitude de chacun de ces effecteurs à agir comme facteur de virulence/avirulence est étudiée ainsi que la localisation subcellulaire de la protéine après transfert dans la cellule végétale. La recherche de protéines végétales cibles de ces effecteurs est réalisée par la méthode du double hybride en criblant une banque d'ADNc d'*A. thaliana*. Plusieurs familles d'effecteurs spécifiques à *Ralstonia solanacearum* sont en cours d'étude dans notre laboratoire, parmi celles-ci la famille d'effecteurs « GALA » nous semble particulièrement intéressantes car ces protéines contiennent des motifs de type F-box. Ce domaine est bien caractérisé chez les eucaryotes où il contrôle la dégradation spécifique de protéines par la voie d'ubiquitinylation. Nous présenterons les derniers résultats concernant cette famille d'effecteurs « GALA ».

O-14 LES RÉCEPTEURS TON B-DÉPENDANTS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV *CAMPESTRIS*

LAUBER E., MEYER D., BLANVILLAIN S., LAUTIER M., BOULANGER A., GUYNET C., LECOURTOIS V., VASSE J., ZISCHEK C. ET ARLAT M.

LIPM, UMR CNRS-INRA, Chemin de Borde Rouge BP27 31326 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

Xanthomonas campestris pv *campestris* (Xcc) est l'agent responsable de la Pourriture Noire des Crucifères. Le génome de ce pathogène épiphyte a récemment été séquencé et nous avons réalisé une analyse détaillée *in silico* de son génome en nous intéressant plus particulièrement aux gènes impliqués dans les voies de perception/transduction de signaux (gènes récepteurs/régulateurs). Cette analyse montre une sur-représentation des protéines de la voie TonB et notamment des récepteurs TonB-dépendants (76 chez Xcc, contre en moyenne 5 à 25 pour d'autres génomes bactériens). Classiquement, les récepteurs TonB-dépendants interviennent dans l'acquisition du fer, mais il a aussi été établi que le récepteur TonB-dépendant PrhA de *Ralstonia solanacearum*, intervient dans la reconnaissance d'un signal plante. De plus, il a été montré chez Xcc que la voie TonB jouerait également un rôle dans la mise en place de la HR. L'ensemble de ces données nous a conduit à envisager une analyse plus détaillée de ces gènes chez Xcc. Les récepteurs TonB dépendants de 28 bactéries Gram négatifs dont les génomes sont séquencés ont été comparés et l'arbre phylogénétique réalisé a permis de définir 4 grands groupes de TBDR : - les groupes I, II et III contiennent majoritairement des TBDR de Xcc dont la plupart sont apparentés à des récepteurs TonB-dépendants de *Caulobacter crescentus* CB15, une bactérie aquatique non pathogène, taxonomiquement éloignée de Xcc. - le groupe IV renferme des TBDR de toutes les bactéries incluses dans cette étude et notamment tous les TBDR d'*Escherichia coli*. Une étude du profil d'expression de l'ensemble des TBDR de Xcc montre que seuls 9 TBDR sont régulés par le statut en fer. Ces 9 TBDR appartiennent au groupe IV et sont de plus les seuls à posséder une Fur-Box en amont des séquences codantes, suggérant une expression contrôlée par la protéine Fur. Une analyse détaillée des gènes avoisinant les TBDR appartenant aux groupes I, II et III a révélé la présence fréquente de gènes codant pour des protéines impliquées dans la dégradation de composés végétaux (cellulases, pectinases, polygalacturonases...) et/ou de gènes régulateurs et/ou de transporteurs de sucres. Ainsi, ces récepteurs pourraient faire partie de cassettes fonctionnelles impliquées dans la dégradation des composés végétaux pouvant servir de substrats pour la bactérie au cours du processus infectieux ou lors de sa survie dans l'environnement. Les premiers résultats de l'étude systématique par mutagenèse dirigée des récepteurs TonB-dépendants de Xcc suggèrent une intervention dans le pouvoir pathogène pour certains d'entre eux. Notre hypothèse de travail propose que les TBDR de Xcc appartenant au groupe IV de l'arbre phylogénétique auraient une fonction d'acquisition du fer, tandis que ceux présents dans les groupes I, II et III auraient une ou des fonctions spécifiques reflétant des modes de vie particuliers liées à leur association avec les végétaux.

O-15 GÉNOME DE *SPIROPLASMA CITRI* : LES PLASMIDES PORTENT DES GÈNES CODANT DES PROTÉINES POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉES DANS LA TRANSMISSION PAR INSECTE.

JOEL RENAUDIN, XAVIER FOISSAC, COLETTE SAILLARD, PATRICIA CARLE, NATHALIE BERHO, NABIL KILLINY, SYBILLE DURET ET JOSEPH-MARIE BOVÉ *1

INRA, 71 avenue Edouard Bourlaux, BP81 33883 VILLENAVE DORNON CEDEX, FRANCE

Le génome (1,8 Mpb) de *Spiroplasma citri* GII-3 (souche transmissible par insecte et pathogène) a été séquencé. Environ 19.500 lectures ont été assemblées en 84 contigs et 77 d'entre eux, représentant 1.671 kpb, ont été positionnés sur la carte génétique du chromosome. Les 7 autres contigs représentent des éléments extrachromosomiques circulaires. Ces plasmides dont les tailles s'échelonnent de 7,9 à 35,3 kpb ont été respectivement désignés pSci1a, pSci1 à pSci6. Les 6 plasmides, pSci1 à pSci6, possèdent une séquence conservée de 65 nucléotides qui a été utilisée comme sonde pour leur détection. Ces plasmides portent les gènes codant les protéines putatives TraD-TraG, TrsE-TraE et Soj-ParA impliquées respectivement dans l'intégration dans le chromosome, le transfert d'ADN de cellule à cellule, et dans la répartition des replicons. Le plasmide pSci6 porte le gène codant la protéine P32 et les plasmides pSci1 à pSci5 portent des gènes codant 8 protéines différentes appartenant à la même famille des "spiroplasma-adhesion related proteins" (sarpins). L'une d'entre elles, P82, a été identifiée comme étant l'antigène majeure d'un mutant dépourvu de spiraline, la protéine membranaire la plus abondante de *S. citri*. Ces protéines possèdent des caractéristiques communes: une séquence signal fortement conservée, suivie de 6 à 8 répétitions d'une séquence d'environ 40 acides aminés (aa), une région centrale conservée de 340 transmembranaire. L'extrémité C-terminale, un domaine variable de 110 aa et une hélice C-terminale possède une région riche en arginine et lysine et, pour certaines d'entre elles, une région riche en aspartate et glutamate. L'analyse des ADN génomiques et des protéines de souches transmissibles et non transmissibles de *S. citri* a montré que les protéines P32 et les sarpins sont absentes dans les souches non transmissibles. Les plasmides portant les gènes correspondants sont également absents. Ces observations suggèrent une implication de ces protéines dans les interactions du spiroplasma avec son insecte vecteur. Des expériences visant à curer les plasmides des souches transmissibles et à exprimer un ou plusieurs gènes de sarpins dans les souches non transmissibles sont en cours.

1 Les auteurs remercient toutes les personnes ayant participé au séquençage du génome de *Spiroplasma citri*.

O-16 UN ACIDE AMINE DANS LE HELPER DU CAMV CONTROLE LA SPECIFICITE DE TRANSMISSION PAR INSECTE VECTEUR

STÉPHANE BLANC, ARANZAZU MORENO, EUGÉNIE HÉBRARD, MARILYNE UZEST ET ALBERTO FERERES.

INRA/CIRAD, TA 41/K, Campus International de Baillarguet 34398 MONTPELLIER, FRANCE

L'immense majorité des virus de plantes utilisent un vecteur pour assurer leur transmission d'un hôte à un autre. Le mode de transmission le plus fréquemment adopté est nommé mode « non-circulant ». Dans ce cas, le virus n'effectue pas de cycle dans le milieu intérieur du vecteur et l'association entre les deux est externe et localisée au niveau des pièces buccales de l'insecte, le plus souvent des « stylets ». Un motif protéique viral est supposé reconnaître un récepteur ou site d'attachement au niveau de la cuticule tapissant le canal alimentaire et/ou salivaire dans ces stylets. Ce récepteur hypothétique est totalement inconnu et l'interaction avec les protéines virales est en général considérée comme relativement peu spécifique. Pour de nombreux genres de virus, et en particulier le genre Caulimovirus, c'est une protéine non structurale (facteur assistant de la transmission) qui assurerait la reconnaissance et l'attachement à ce récepteur, formant un pont moléculaire entre particules virales et vecteur. Bien que le facteur assistant de la transmission (P2) du Cauliflower mosaic virus (CaMV) soit très bien caractérisé sur un plan biochimique, le domaine reconnaissant le vecteur restait la principale inconnue pour cette molécule. Une série d'observations indépendantes et concordantes nous a permis d'identifier une position d'acide aminé de P2 qui est directement impliquée dans la reconnaissance du vecteur. Neuf substitutions de cet acide aminé entraînent des variations différentielles dans l'efficacité d'une gamme de cinq espèces vectrices pouvant aller de réductions légères ou sévères à une abolition totale. Nos résultats représentent la première identification du domaine d'un facteur assistant de la transmission directement impliqué dans la reconnaissance du vecteur, ils démontrent une grande spécificité pour cette interaction. Enfin, un mutant spontané obtenu par transmissions successives par une seule espèce de pucerons, confirme que l'adaptation du CaMV à un vecteur particulier ne requiert qu'une mutation ponctuelle et indique que cette adaptation peut-être très rapide.

O-17 MICRO-EVOLUTION OF (A)VIRULENCE GENES OF *C. FULVUM* DRIVEN BY CF GENES IN TOMATO.

P.J.G.M. DE WIT

Wageningen University, Binnenhaven 5 6709 WAGENINGEN, THE NETHERLANDS

In my talk I will focus on the *Avr* and *Cf* genes of *C. fulvum*. So far, we have cloned four *Avr* genes that all encode small cysteine-rich peptides secreted by *C. fulvum* during colonization of tomato leaves. Recognition of *Avr* gene-encoded proteins is mediated by *Cf* resistance gene products and leads to a hypersensitive response (HR). *C. fulvum* avoids recognition and subsequent induction of HR by various mechanisms: the *Avr* gene (i) is absent (*Avr9*; *Avr4E*), (ii) contains point mutations in the ORF leading to protease-sensitive elicitors or a frame shift mutation leading to truncated non-active elicitors (*Avr2*, *Avr4*), (iii) contains point mutations in the ORF leading to production of stable non-active elicitors (*Avr4E*) or (iv) contains transposon insertions leading to lack of *Avr* protein production (*Avr2*). The biochemical basis of the gene-for-gene system implies that an *Avr* gene product directly interacts with the *Cf* gene product, but this could not be proven so far. Direct interaction between *Avr* proteins and R proteins is an exception rather than the rule. Although all *Avr* genes are supposed to represent virulence functions, deletion of single genes did not have significant effects on fungal growth in susceptible tomato cultivars. Presently, we plan to simultaneously knock down several *Avr* genes by RNAi. For two *Avr* proteins we have indications for their biological functions. The *Avr4* elicitor is a chitin-binding protein that can protect fungi against basic plant chitinases. *Avr4* proteins encoded by virulent alleles in strains of *C. fulvum* are no longer recognised by *Cf-4* plants, but still bind to chitin, suggesting that chitin-binding by *Avr4* could represent a defensive virulence function. *Avr2* is a cysteine protease inhibitor. For recognition of the *Avr2* elicitor, in addition to *Cf-2*, the tomato *Rcr3* cysteine protease is required. *Rcr3* can be inhibited by *Avr2*, but inhibition is not sufficient to trigger HR. Most likely, in addition to inhibition a conformational change of *Rcr3* is induced by *Avr2*.

O-18 SEARCH AND CHARACTERIZATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA* COMPONENTS INVOLVED IN THE PERCEPTION OF THE BACTERIAL PATHOGEN, *RALSTONIA SOLANACEARUM*

LAURENT DESLANDES, MAUD BERNOUX, JOCELYNE OLIVIER, JIAN HU, MARIE-LISE MADDELEIN AND YVES MARCO

LIPM, UMR CNRS-INRA, Chemin de Borde Rouge, 31320 CASTANET TOLOSAN, FRANCE

Bacterial wilt caused by the phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum* is one of the most important plant diseases world-wide. RRS1-R, a R protein whose structure combines the TIR-NBS-LRR domains found in several R proteins and a WRKY motif characteristic of some plant transcriptional factors, confers broad spectrum resistance to several strains of this pathogen. PopP2, a *Ralstonia solanacearum* type III effector which belongs to the YopJ/AvrRxv protein family, is the avirulence protein recognized by RRS1-R. A direct interaction between PopP2 and RRS1-R was detected using the yeast split-ubiquitin two-hybrid system. Both R and Avr proteins colocalize in the nucleus and the nuclear localization of RRS1-R is dependent upon the presence of PopP2. Search for other components of a multiprotein complex involved in the perception of the pathogen has been initiated and led to the identification of candidate proteins capable of interacting with RRS1-R and/or PopP2. The validation and characterization of some of these candidates is in progress.

O-19 IMPLICATION DU FACTEUR D'INITIATION DE LA TRADUCTION EIF4E DANS LA SENSIBILITÉ DES PLANTES AUX POTYVIRUS

VALÉRIE NICAISE, SYLVIE GERMAN-RETANA, THIERRY MICHON, BÉNÉDICTE DOUBLET, GENEVIÈVE ROUDET-TAVERT ET OLIVIER LE GALL

UMR GDPP, INRA Aquitaine, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

En tant que pathogènes obligatoires, les virus dépendent de la machinerie de leur hôte pour réaliser leur cycle. Les étapes précoces de l'infection constituent des événements cruciaux où les protéines virales doivent être capables d'interagir avec des facteurs cellulaires afin de mettre en place la traduction et la réplication virales. Une réaction incompatible s'explique donc souvent par le fait qu'une des protéines virales n'est pas adaptée à une des protéines de l'hôte et par conséquent se caractérise par une résistance récessive.

Plusieurs gènes de résistance récessifs aux potyvirus ont été identifiés chez différentes espèces végétales (piment, laitue, tomate, *Arabidopsis thaliana*, pois). Ils codent pour des protéines cellulaires impliquées dans l'initiation de la traduction, les facteurs eIF4E (*Eukaryotic Initiation Factor 4E*).

Afin de savoir si le facteur eIF4E correspond au déterminant d'accueil d'une plante à un potyvirus, des expériences de complémentation fonctionnelle ont été réalisées en utilisant un recombinant du LMV (*Lettuce mosaic potyvirus*) qui exprime le facteur eIF4E issu de laitue sensible et qui est capable de restaurer la sensibilité chez des laitues résistantes. Ce virus LMV-4E a été inoculé à des espèces non hôtes du LMV (tournesol, chicorée, piment...).

En parallèle, dans le cadre du modèle laitue/LMV, nous avons effectué une mutagenèse dirigée d'eIF4E de laitue en ciblant les acides aminés impliqués dans l'interaction avec la coiffe des ARNm et avec le facteur de traduction eIF4G, ceci afin de préciser son rôle dans l'infection et notamment d'identifier les acides aminés-clé d'eIF4E importants pour le cycle viral. L'effet biologique de ces mutations a été testé à l'aide de LMV recombinants exprimant chacune des formes mutées d'eIF4E.

De plus, des mutants homozygotes d'*Arabidopsis thaliana* disruptés au niveau de gènes codant pour les différents facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E, eIF4G, PABP) ont été obtenus et infectés par différents virus, afin d'identifier le rôle de certains des facteurs de la machinerie d'initiation de la traduction cellulaire sur le cycle viral.

Enfin, la technique d'extinction génique via un vecteur viral (VIGS) chez la plante modèle *Nicotiana benthamiana* est en cours d'étude afin de démontrer s'il existe un mécanisme général faisant intervenir les facteurs eIF4E au cours de l'infection des plantes par des potyvirus.

O-20 THE *RALSTONIA SOLANACEARUM* TYPE III EFFECTOR POPA IS A Ca^{2+} -DEPENDENT LIPID-BINDING PROTEIN THAT INTEGRATES INTO MEMBRANE BILAYERS *IN VITRO* AND *IN VIVO*.

HARALD KELLER, JUDITH RACAPÉ, LASSAAD BELBAHRI, FRANCIS PARLANGE, ANTOINE MARAIS, SANDRINE PUVEREL, JAN LOCHMAN, BENOIT LACOMBE AND MICHEL NICOLE.

INRA, 400 route des Chappes, BP167 06903 SOPHIA ANTIPOLIS, FRANCE

Pathogen-derived elicitors trigger the onset of plant defense responses, which frequently result in cell death characterizing the hypersensitive response (HR). The elicitor protein PopA, which is produced by the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*, is externalized by the bacterium through a type III secretion system (TTSS) and triggers an HR on tobacco plants (Arlat et al., 1994). Because TTSS allows not only the secretion of proteins, but also the injection into eucaryotic host cells, it is unclear whether PopA induces the HR from the inside or the outside of the plant cell. In a previous work, we described the generation of transgenic tobaccos that harbour the popA gene under the control of the pathogen-inducible hsr203J promoter (Belbahri et al., 2001). These plants were designed to either confine the transgene product to the cytosol, or to secrete it, and were thus excellent tools to analyze the localization of HR induction by PopA in tobacco cells. Here we show that in these plants the HR phenotype was correlated to a localization of PopA to the plasma membrane. The protein was also found to be associated to endomembrane systems, like the tonoplast and thylakoid staples. Additional experiments showed that PopA possesses the typical characteristics of a lipid binding protein, including a high affinity for the essential membrane elements, phospholipids, sterols, and sphingolipids, and a requirement for Ca^{2+} . Furthermore, we show that PopA is able to oligomerize and to integrate into artificial and biological membranes, thus generating pores *in vitro* and *in vivo*. Taken together, these characteristics allowed us to discuss the possible roles of the protein for bacterial pathogenesis, and for plant resistance.

Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C., and Boucher, C.A. (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J.* 13, 543-553.

Belbahri, L., Boucher, C., Candresse, T., Nicole, M., Ricci, P., and Keller, H. (2001). A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible. *Plant J.* 28, 419-430.

O-21 SPECIFICATION OF RESPONSES TO DIFFERENT STRESSES IN ARABIDOPSIS

ROBERTO SOLANO

Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Madrid, Spain

The cell is able to combine the same signalling pathways in different ways to determine different responses to different stresses. A clear example of it is the plant's response to pathogens and wounding. In both cases the plant activates the jasmonate (JA) and ethylene (ET) pathways, but combine them in different ways to achieve different and specific responses to each stress. Thus, understanding plant's responses to stress requires not only the discovery of the pathways involved, but also the understanding on how these pathways are combined by the cell and which are the molecular players that determine these interactions.

We have identified three factors, ERF1 (Ethylene-Response-Factor1), JIN1 (Jasmonate-Insensitive1) and JAI4 (Jasmonate-Insensitive4) participating in the activation of these defences:

ERF1 is a key activator of defence responses against necrotrophs. Its expression is induced upon necrotrophic pathogens infection and regulates "in vivo" the expression of defence-related genes, such as *PDF1.2* and *b-CHI*. Constitutive expression of *ERF1* enhance plant resistance to necrotrophic fungi (1). *ERF1* expression is also regulated by ET and JA, and this induction depends on both signalling pathways acting simultaneously (2,3). In fact, mutations that block any of these signalling pathways (ET or JA) block the induction of *ERF1* expression by any of the hormones. Thus, this explains, at the molecular level, the cooperation of both signals in the activation of defence genes.

JIN1 and JAI4 have been identified and cloned by means of a screen for JA-insensitive mutants. *JIN1* encodes AtMYC2, a nuclear localized bHLHzip transcription factor, whose expression is rapidly up regulated by JA (4). Gain-of-function experiments confirmed the relevance of AtMYC2 in the activation of JA signalling. AtMYC2 differentially regulates the expression of two groups of JA-induced genes. The first group includes genes involved in defence responses against pathogens, and is repressed by AtMYC2. Consistently, *jin1* mutants show increased resistance to necrotrophic pathogens. The second group, integrated by genes involved in JA-mediated systemic responses to wounding, is activated by AtMYC2. Conversely, ERF1 positively regulates the expression of the first group of genes and represses the second. These results highlight the existence of two branches in the JA signalling pathway, antagonistically regulated by AtMYC2 and ERF1, that are coincident with the alternative responses activated by JA and ET to two different sets of stresses, namely pathogen attack and wounding.

JAI4 encodes SGT1b, a regulator of SCF E3-ubiquitin ligases. In addition to JA signalling, it is also important in other ubiquitin-regulated processes such as pathogen resistance and auxin responses (5-7). SGT1b thus explain the "crosstalk" between these signalling pathways since it participates in a common process regulating all of them: the ubiquitin-mediated protein degradation.

1-Berrocal y col., 2002. *Plant J.* 29, 23-32. ; 2-Solano y col., 1998. *Genes Dev.* 12, 3703-3714 ; 3-Lorenzo y col., 2003. *Plant Cell.* 15, 165-178; 4-Lorenzo y col., 2004. *Plant Cell.* 16,1938-1950; 5-Austin y col., 2002; *Science.* 295, 2077-2080 ; 6-Azevedo y col., 2002. *Science.* 295, 2073-2076; 7-Gray y col., 2003. *Plant Cell.* 15, 1310-1319

O-22 ANALYSIS OF NITRIC OXIDE SIGNALLING FUNCTIONS IN TOBACCO CELLS CHALLENGED BY THE ELICITOR CRYPTOGEIN

WENDEHENNE D., LAMOTTE O., LECOURIEUX D., RANJEVA R. AND PUGIN A.

INRA-Université de Bourgogne, 17 rue Sully, BP 86510 21065 DIJON, FRANCE

Cryptogein, an elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*, induces a hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance in tobacco. Here, we examined the intermediary signalling events mediating nitric oxide (NO) production and analysed NO signalling activities in the cryptogein-induced transduction pathway. We demonstrated that cryptogein triggers within minutes a NO production in epidermal sections from tobacco leaves as well as in tobacco cell suspensions (1, 2). Cryptogein induced-NO production occurred in several cellular compartments including the plastids and is sensitive to nitric oxide synthase (NOS) but not nitrate reductase inhibitors. This production is controlled by a signalling cascade involving Ca²⁺ influx and phosphorylation events. Using transgenic tobacco cells in which the Ca²⁺ reporter aequorin was addressed in the cytosol or in the nucleus, we provided evidence that NO participates in the elicitor-mediated elevation of cytosolic free Ca²⁺ concentration through the mobilization of Ca²⁺ from intracellular stores. By contrast, NO is not involved in cryptogein-induced nuclear free Ca²⁺ concentration (3). Accordingly, NO released by the donor diethylamine NONOate promoted an increase in cytosolic but not nuclear free Ca²⁺ concentration, which was sensitive to intracellular Ca²⁺ channel inhibitors. Moreover, NO appears to be involved in the pathway(s) leading to the accumulation of transcripts encoding the heat-shock protein TLHS-1, the ethylene-forming enzyme cEFE-26, and cell death. In contrast, NO does not act upstream of the elicitor-induced activation of MAPK, the opening of anion channels, nor expression of GST, LOX-1, PAL and PR-3 genes. Collectively, our data indicate that NO is intimately involved in the signal transduction processes leading to cryptogein-induced defense responses.

- (1) Foissner et al. (2000). In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* 23, 817-824. (2)
- (2) Lamotte et al. (2004). Analysis of nitric oxide signalling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135, 516-529.
- (3) Lecourieux et al. (2004). Elicitors induce specific changes in nuclear free calcium in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol.*, submitted GDR Calcium <http://www.gdr2688.ups-tlse.fr/index.php>

O-23 FUNCTIONAL ANALYSIS OF PATATIN-LIKE LIPID ACYL HYDROLASES IN ARABIDOPSIS ANTIMICROBIAL DEFENSE

T. HEITZ, SYLVAIN LA CAMERA, PIERRETTE GEOFFROY, GWENDOLINE RAHIM, HALA SAMAHA, GUILLAUME GOUZERH, MICHEL LEGRAND.

IBMP, UPR CNRS, 12 rue du Général Zimmer, 67000 STRASBOURG, FRANCE

Lipid catabolism and especially fatty acid mobilization is an important feature of plant stress responses and development. We are investigating the contributions of genes encoding phospholipases A and/or galactolipases (collectively named lipid acyl hydrolases, LAH) to various membrane lipid hydrolysis events triggered upon pathogen attack. An important role anticipated for such enzymes is to provide precursors for the biosynthesis of oxylipins, a wide array of fatty acid derivatives that are critical to plant defense responses. Oxylipins function as potent defense signals (e.g. jasmonates), host cell death modulators, or phytoalexins (1). Exploration of the Arabidopsis genome has revealed the existence of numerous structural families of potential LAH genes, with members being upregulated in response to biotic stress. We have given priority to the functional study of LAHs related to patatin, the major storage protein of potato tuber, as our previous work in tobacco has demonstrated the induction of patatins with high LAH activity upon viral, bacterial and fungal challenge. This induction occurs coordinately with membrane lipid consumption and the activation of numerous branches of oxylipin biosynthetic pathways (2,3). The Arabidopsis patatin-like gene family (PatLPs) comprises 9 members, two of which (PatLP2 and PatLP7) being strongly upregulated in leaves challenged with pathogens. We showed that PatLP2 protein accumulation in response to *Botrytis cinerea* or *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (avrRpt2) is dependent on jasmonic acid and ethylene signaling, but is salicylic acid independent. Expression of a PatLP2-GFP fusion and analysis of recombinant PatLP2 indicates that PatLP2 encodes a cytoplasmic lipid acyl hydrolase with preferential galactolipase activity. Transgenic plants with altered levels of PatLP2 protein were generated and assayed for pathogen resistance. Unexpectedly, plants silenced for PatLP2 expression displayed enhanced resistance to *B. cinerea*, whereas plants overexpressing PatLP2 were much more sensitive to this necrotrophic fungus. We established also a positive correlation between the level of PatLP2 expression in transgenic plants and sensitivity to paraquat, a cell-death promoting chemical. Furthermore, repression of PatLP2 expression also increased resistance to avirulent *P. syringae* but had no effect on virulent bacteria multiplication, while PatLP2-overexpressing plants multiplied avirulent bacteria close to the titer reached by virulent bacteria. Collectively, the data indicate that PatLP2-encoded lipolytic activity is recruited by pathogens with different lifestyles to facilitate host colonization. Particularly, PatLP2 potentiates plant cell death upon infection by *Botrytis* and reduces the efficiency of the hypersensitive response in restricting the multiplication of avirulent bacteria. The involvement of oxylipins in the mediation of PatLP2 effects is currently under investigation.

1. La Camera et al. (2004) Immunol. Rev. 198, 267-284.
2. Dhondt et al. (2000) Plant J. 23, 431-440.
3. Dhondt et al. (2002) Plant J. 32, 749-762.

This work was partly supported by the Génoplante program.

O-24 IDENTIFICATION OF PLANT FORMIN GENES INVOLVED IN THE FEEDING SITE FORMATION INDUCED BY ROOT-KNOT NEMATODES

Bruno FAVERY, Liudmilla CHELYSHEVA, Philippe LECOMTE, Fabien JAMMES Janice DE ALMEIDA-ENGLER, Pierre ABAD

UMR Interactions Plantes-Microorganismes et Santé Végétale, INRA 1064-UNSA-CNRS 6192, 400 route des Chappes - B.P. 167 - 06903 Sophia Antipolis, Cedex, France

Sedentary plant-parasitic nematodes *Meloidogyne* spp. are major pests causing considerable crop losses worldwide. These root-knot nematodes are able to induce the redifferentiation of root cells into multinucleate nematode feeding sites. These hypertrophied cells known as giant cells result from repeated nuclear division without cytokinesis. Nematodes withdraw the nutrients required for their development from NFS until the completion of their life cycle. To obtain a more comprehensive view of the molecular mechanisms underlying the induction and the maintenance of the giant cell, we focused on the functional analysis of plant genes identified by a promoter trap strategy in *Arabidopsis thaliana*.

Analysis of selected T-DNA tagged lines allowed the characterization of plant genes involved in different cellular processes. We will present the functional analysis of a formin AtFH6, an actin-nucleating protein that stimulates *de novo* polymerization of actin filaments. We showed that among the 20 *Arabidopsis* formin genes, two additional formin genes were upregulated in response to nematode. We also demonstrated that the AtFH6 protein was anchored to the plasma membrane and uniformly distributed. Suppression of the budding defect of a yeast formin mutant showed that AtFH6 regulates polarized growth by controlling the assembly of actin cables. Our results suggest that AtFH6 might be involved in the isotropic growth of hypertrophied feeding cells via the reorganization of the actin cytoskeleton (Favery et al., 2004).

O-25 ROLE OF THE ARABIDOPSIS MYB TRANSCRIPTION FACTOR ATMYB30 IN THE CONTROL OF DISEASE RESISTANCE AND HYPERSENSITIVE CELL DEATH

RIVAS S., RAFFAELE S., DANIEL X., VAILLEAU F., AND ROBY D.

Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes, UMR CNRS-INRA, BP 52627, 31326 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

In plants, one of the most efficient resistance reactions to pathogen attack, is the so-called Hypersensitive Response (HR) characterized by a rapid and localized cell death at the inoculation site. To identify genes involved in the regulation of HR-related cell death programmes, we searched for genes early and specifically induced during the HR. Among the different HR-related, early induced genes that we identified, we previously showed that the AtMYB30 gene is specifically, rapidly and transiently expressed during incompatible interactions between Arabidopsis and bacterial pathogens (Daniel et al., 1999). Its expression was also found to be deregulated in Arabidopsis mutants affected in the control of cell death initiation. AtMYB30 presents homology to plant MYB transcription factors which play a central role in the regulation of a variety of developmental and metabolic programs, including responses to environmental stimuli. Using sense AtMYB30 tobacco and Arabidopsis lines, we demonstrated that overexpression of AtMYB30 (i) accelerates and intensifies the appearance of the HR in response to avirulent bacterial pathogens, (ii) causes HR-like responses to virulent bacterial pathogens, and (iii) increases resistance against different avirulent and virulent bacterial pathogens, and a virulent biotrophic fungal pathogen, *Cercospora nicotianae* (Vailleau et al., 2002). In antisense AtMYB30 tobacco lines, the HR cell death was significantly decreased or suppressed. Taken together, these results strongly suggest that AtMYB30 is a positive regulator of the hypersensitive cell death. In order to understand AtMYB30 function, two complementary approaches have been developed. First, we obtained Arabidopsis double mutants by crossing lines carrying a mutation in known regulators of resistance/defense responses with the AtMYB30 sense or antisense lines to address whether these regulatory genes control the HR phenotypes conferred by deregulation of AtMYB30 expression. Second, using Affymetrix whole genome arrays, we performed an analysis of the transcriptional changes occurring in AtMYB30 sense and antisense lines upon infection. Putative AtMYB30 target genes identified through this strategy are mainly related to lipid metabolism, suggesting that AtMYB30 might play a regulatory role on the production of lipidic cell death-related signals. Detailed results obtained using these two strategies will be presented. Finally, since AtMYB30 overexpression does not induce spontaneous cell death, we propose that AtMYB30 may act together with additional proteins to initiate HR and defense responses. New strategies aimed to identify proteins that may interact with, and work together with AtMYB30 in the initiation of the hypersensitive cell death programme, will also be discussed.

O-26 ANALYSE GÉNÉTIQUE DE LA RÉSISTANCE DU RIZ À *MAGNAPORTHE GRISEA*

JEAN-BENOIT MOREL, DIDIER THARREAU, VÉRONIQUE CHALVON, LOÏC FONTAINE, CORINNE MICHEL, MARC-HENRI LEBRUN, JEAN-LOUP NOTTÉGHM.

INRA-CIRAD, TA 41/K Campus international de Baillarguet 34398 MONTPELLIER CEDEX, FRANCE

Chez les Monocotylédones, et notamment le riz, les régulateurs centraux des réactions de défense sont encore rares à avoir été identifiés. En particulier, aucune analyse de mutant n'a permis de mettre en évidence des gènes comme les gènes d'*Arabidopsis* NPR1 ou EDS1. Prenant avantage des récents développements technologiques réalisés dans le cas du riz, espèce modèle des céréales, nous avons mené une recherche ciblée (génétique inverse) et aléatoire (génétique directe) de mutants de riz affectés dans leur réaction au champignon pathogène *Magnaporthe grisea*. Dans notre approche de génétique directe, plus de 7000 lignées d'insertion par ADN-T ont été examinées pour leur réaction à un isolat normalement virulent de *M. grisea*. Près de 90 lignées ont été identifiées et se répartissent en 3 classes phénotypiques : plus sensibles (EDS, 17%), plus résistants (EDR, 33%) et présentant des lésions spontanées en absence d'infection (LSD, 50%). Les mutations obtenues affectent la résistance en général à plusieurs isolats de *M. grisea* ainsi que l'expression de certains gènes de défense. L'analyse de plusieurs mutants LSD révèle plusieurs sous-groupes de mutations qui se caractérisent notamment par leur comportement différentiel vis-à-vis de l'expression de peroxydases. L'analyse d'un mutant EDR suggère que ce mutant n'est pas de type CPR (Constitutive Pathogenesis Related) et renforce l'hypothèse que la photosynthèse ainsi qu'un gène mis en évidence par analyse transcriptome (voir Poster E. Vergne et al) jouent un rôle important lors de la résistance. L'analyse génétique de plus de 70 lignées indique que comme chez *Arabidopsis*, la fréquence d'étiquetage par l'ADN-T est faible dans le riz. Dans notre approche de génétique inverse, un ensemble de plus de 2000 gènes pertinents a été identifié dans le riz grâce à un réseau d'experts. Plus de 150 lignées d'insertion correspondantes ont été identifiées et testées pour leur résistance à *M. grisea*. Cinq lignées présentent des phénotypes altérés de résistance. L'ensemble de ce travail constitue une première en terme d'identification de gènes de riz impliqués dans la résistance. L'analyse génétique et moléculaire de certains de ces mutants sera présentée. Dans l'objectif de faire du riz une espèce utile à la communauté pour d'autres analyses fonctionnelles, un système d'infection par *Fusarium* sur panicule a été mis en place. L'ensemble des possibilités de génomique fonctionnelle associées à l'espèce modèle riz sera présenté.

Ce travail a été financé par le programme Génoplante II OsCrR1

O-27 IMPORTANCE DU FER DANS L'INTERACTION *ARABIDOPSIS THALIANA* - *ERWINIA CHRYSANTHEMI*

ALIA DELLAGI, DIEGO SEGOND, MARTINE RIGAULT, FRÉDÉRIC GAYMARD*, CAMILLE ROUX ET DOMINIQUE EXPERT

Laboratoire des Interactions Plantes Pathogènes UMR 217 INRA, INA-PG, Université Paris 616 Rue Claude Bernard 75005 PARIS, France

**Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5004, Agro-M/Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Recherche Agronomique/Université Montpellier 2, 34060 Montpellier, Cedex 1, France*

Les dégâts provoqués sur plusieurs cultures maraîchères et ornementales par les pourritures molles sont dus, entre autres, à la bactérie *Erwinia chrysanthemi*. Cette entérobactérie est aussi capable d'infecter *Arabidopsis thaliana*. Les facteurs intervenant dans le pouvoir pathogène de la bactérie sont essentiellement ses pectinases qui dégradent les parois des cellules végétales. *E. chrysanthemi* possède également des systèmes d'assimilation du fer impliquant deux sidérophores et des systèmes de protection contre le stress oxydant qui sont importants pour la survie de la bactérie au cours de l'infection. Par ailleurs, les composants de l'enveloppe bactérienne LPS et EPS sont des facteurs du pouvoir pathogène importants. Le modèle *A. thaliana* / *E. chrysanthemi* est utilisé au laboratoire afin de déterminer la nature moléculaire des réponses de la plante à une infection. A la suite d'un criblage différentiel, nous avons mis en évidence un transcrite codant une ferritine (Atfer1) qui est induit chez *A. thaliana* en réponse à une infection par la souche 3937 de *E. chrysanthemi*. Les ferritines sont des protéines ubiquitaires de stockage du fer. Elles sont organisées sous forme de sphères de 24 sous-unités qui peuvent stocker jusqu'à 4500 atomes de fer. Chez les plantes, ces protéines sont localisées dans les plastes et les mitochondries. Chez les animaux, elles sont cytosoliques. Le contrôle de leur expression chez les plantes est essentiellement transcriptionnel. En revanche un contrôle post-transcriptionnel est essentiel à la régulation des ferritines animales. L'expression des ferritines animales ou végétales est fortement induite par un apport de fer. Le génome d'*Arabidopsis* comporte 4 gènes de ferritines Atfer1,2,3 et 4. Nous avons étudié l'expression du gène Atfer1 par RT-PCR, northern blots et fusion GUS. Nos résultats indiquent que l'infection par *E. chrysanthemi* donne lieu une régulation fine de l'expression de Atfer1 via des éliciteurs bactériens : sidérophores et LPS et par la molécule signal NO. Par ailleurs, un mutant T-DNA n'exprimant plus Atfer1 devient plus sensible à l'infection par *E. chrysanthemi* indiquant un rôle important de cette protéine dans la résistance de base de *A. thaliana*.

O-28 POPULATION BIOLOGY AND EVOLUTION OF BACTERIAL PATHOGENS

MARTIN MAIDEN

University of Oxford, Department of Zoology, Peter Medawar Building South Parks Road, Oxford OX1 3SY, UK

Recent technical advances in genomics have led to a renaissance in the study of the population biology and evolution of pathogens. Genomic technology has enabled two advances, first: the accessibility of complete genome sequences and, second: high throughput nucleotide sequence technology makes the analysis of large population samples of bacteria feasible. Consequently it is now possible to carry out studies of the genetic variation of virtually any part of a microbial genome for large numbers of isolates. Such studies have confirmed that microbial populations are highly diverse, but that this diversity is structured in a number of ways. Early models of the evolution and population biology of bacteria assumed clonal populations. A clonal population is inherent in populations of an organism that divides exclusively by asexual reproduction and binary fission. This was thought to be the predominant means of evolution of bacterial species until the discovery of frequent horizontal genetic exchange in many bacterial populations. The converse of the clonal population and non-clonal population is where sufficient recombination exists within a population that all clonal signal is destroyed. Clonal populations are typified by the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis* which appears to have an entirely clonal population structure, with no evidence of recombination while conversely populations of the gastric bacterium *Helicobacter pylori* which appear to be non-clonal which very frequent recombination. These population structures require different analysis techniques with conventional phylogenetic tree-building approaches being appropriate for highly clonal structures but with other techniques being required to analyse recombining populations. In practice most bacteria exhibit intermediate population structures in which the presence of clonally related organisms can be easily recognised, but in which long-term phylogeny has been erased by recombination. The first step in the analysis of any bacterial population is, therefore, to establish the patterns of structuring present in that population and to identify the most appropriate models for interpretation of that structure. Currently this means using variety of different analysis approaches, depending on the relative contribution of recombination and point mutation for the particular organism under investigation. This lecture will discuss a number of different bacterial populations and illustrate how the impact of different population structures on the interpretation of epidemiological data. Finally, implications molecular sequence data on defining bacterial species will be explored.

O-29 IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉS À LA RECRUESCENCE DE L'ÉCHAUDURE DES FEUILLES DE LA CANNE À SUCRE CAUSÉE PAR *XANTHOMONAS ALBILINEANS*

CHAMPOISEAU P., RENIER A., DAUGROIS J.-H., ROYER M., ROTT P.

CIRAD-INRA-ENSAM, UMR BGPI TA41/K Campus international de Baillarguet 34398
MONTPELLIER, FRANCE

La recrudescence de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre au cours des quinze dernières années a conduit à émettre l'hypothèse de l'émergence d'une nouvelle souche de *X. albilineans*. L'étude de la variabilité du génome de 218 souches de l'agent pathogène a permis d'identifier huit groupes génétiques (PFGE A à H) par électrophorèse en champ pulsé. Les souches associées à la recrudescence de la maladie ont toutes été classées dans le groupe PFGE B (Davis et al., 1996. *Phytopathology*, 87:316-324). Par ailleurs, chez *X. albilineans*, la pathotoxine albicidine est une composante majeure du pouvoir pathogène et elle est à l'origine des symptômes foliaires de la maladie. L'étude des bases génétiques de l'albicidine chez la souche Xa23R1 (Floride) a permis d'identifier trois régions du génome regroupant 20 gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de la toxine. Trois de ces gènes codent pour des enzymes de type NRPS (« non ribosomal peptide synthase ») dont les domaines d'adénylation sont impliqués dans la reconnaissance et l'incorporation des substrats acides aminés dans la chaîne de biosynthèse de la toxine (Royer et al., 2004. *MPMI*, 17:414-427). Deux études de diversité des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine ont été menées afin d'évaluer l'importance de la toxine dans la variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. L'ADN génomique total de 139 souches de *X. albilineans*, originaires de 27 zones géographiques, a été digéré avec l'enzyme HincII puis hybridé avec deux sondes moléculaires contenant l'ensemble des gènes de biosynthèse de l'albicidine. Dix-sept haplotypes et deux groupes génétiques majeurs, nommés ALB-RFLP571-A et ALB-RFLP571-B, ont été identifiés. Les souches de *X. albilineans* associées à la recrudescence de la maladie et appartenant au groupe PFGE B ont toutes été classées dans le groupe ALB-RFLP571-B. La quantité d'albicidine produite in vitro par l'ensemble des souches est très variable, mais aucune relation entre la production d'albicidine et ces groupes génétiques n'a été mise en évidence. Par la suite, quatre domaines d'adénylation des NRPSs de 16 souches de *X. albilineans*, représentatives de la biodiversité connue chez cette espèce, ont été amplifiés et séquencés. Bien que les séquences de ces quatre loci soient très conservées, la variabilité d'un des domaines d'adénylation (NRPS-2) reflète la diversité génétique mise en évidence par RFLP. Trois nucléotides polymorphes permettent de différencier les souches appartenant aux groupes ALB-RFLP571-A et ALB-RFLP571-B. Comme précédemment, aucune relation n'a pu être établie entre la quantité d'albicidine produite in vitro et la diversité génétique de *X. albilineans*. La recrudescence de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre n'apparaît donc pas associée à la quantité d'albicidine produite in vitro ou à la variabilité des enzymes de biosynthèse de l'albicidine. Cependant, une étroite relation entre la diversité de certains gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine et la diversité de l'ensemble du génome a été mise en évidence.

O-30 ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* À DIFFÉRENTES ÉCHELLES SPATIALES AUX ANTILLES FRANÇAISES.

L. FREZAL^(1,2), G. JACQUA,⁽²⁾ ET C. NEEMA⁽¹⁾.

(1) Pathologie végétale, INA-PG, 16, rue Claude Bernard, 75231, Paris cedex 05

(2) Pathologie végétale, INRA URPV, 97170, Prise d'eau. Guadeloupe. FWI

Colletotrichum gloeosporioides est un complexe d'espèces de champignons ascomycètes mondialement répandu, dont de nombreuses espèces sont responsables de l'anthracnose sur une large gamme d'hôtes. Dans les régions tropicales humides, comme dans les îles de la Caraïbe, *C. gloeosporioides* est responsable de l'anthracnose sur l'igname blanche (*Dioscorea alata*). D'après les textes officiels, l'anthracnose de l'igname blanche est apparue en Guadeloupe en 1966. Les épidémies, depuis, sont devenues annuelles et peuvent entraîner des pertes allant jusqu'à 100%. La lutte contre l'anthracnose a été conduite avec l'introduction de cultivars résistants d'igname et l'utilisation de fongicides. A la fin des années 1980s, les principales variétés introduites avaient perdu leur résistance à l'anthracnose et les fongicides avaient totalement perdu leur efficacité. Afin d'identifier les moteurs de l'érosion de la résistance de *D. alata* en Guadeloupe, la structure des populations de *C. gloeosporioides* a été étudiée à l'échelle de la parcelle et à l'échelle continentale. L'étude à l'échelle parcellaire a été effectuée dans la commune de Morne à l'eau en Guadeloupe. 256 souches monoconidiennes ont été isolées à partir de feuilles infectées d'igname collectées sur 6 parcelles de 3 cultivars (2 parcelles par cultivar). Les 3 cultivars étudiés possèdent différents degrés de sensibilité à l'anthracnose : Pacala (très sensible), Kabusah (moyennement sensible) et Tahiti (faiblement sensible). L'étude de la diversité à l'échelle des îles de la Guadeloupe et de la Martinique a été conduite sur un échantillon de souches isolées de feuilles d'igname infectées prélevées sur 5 sites par île (5 points par sites). La diversité génétique a été étudiée pour des marqueurs moléculaires neutres (AFLP) et pour le pouvoir pathogène sur les 3 cultivars Pacala, Kabusah et Tahiti. L'analyse des données AFLP a été effectuée à l'aide des logiciels GENEPOP et ARLEQUIN. L'analyse des données de pouvoir pathogène a été effectuée avec le logiciel SAS. A l'échelle de la parcelle, les résultats montrent une importante diversité génique et génotypique pour les marqueurs AFLP, quels que soient le champ ou le cultivar d'origine de la souche. Une forte différenciation entre parcelles suggère une faible migration de l'agent pathogène au cours d'une même saison de culture. Le cultivar d'origine des souches a un effet significatif sur la distribution des pathotypes, suggérant une adaptation de *C. gloeosporioides* aux cultivars de *D. alata*. Les différences entre les productions de *D. alata* en Guadeloupe et en Martinique aideront à discuter la distribution des pathotypes.

O-31 MALADIE DU HLB DES AGRUMES DANS L'ETAT DE SAO PAULO, BRÉSIL : ASSOCIATION AVEC UNE NOUVELLE ESPÈCE DE *LIBERIBACTER*, *CANDIDATUS LIBERIBACTER AMERICANUS*

EVEILLARD S., TEXEIRA D. C., DANET J.L., SAILLARD C., AYRES J. ET BOVÉ J.M.

INRA, 71 avenue Edouard Bourlaux, BP81 33883 VILLENAVE DORNON CEDEX, FRANCE

Le Huanglongbing (HLB, ex-greening) est une des plus sévères maladies des agrumes. L'agent causal est une alpha-protéobactérie non cultivée du phloème, *Candidatus liberibacter africanus* en Afrique et *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Asie. La maladie n'a jamais été décrite sur le continent américain. Toutefois, *Diaphorina citri*, le psylle vecteur asiatique est présent en Amérique du Sud, du Centre et du Nord (Floride, Texas). En 2004, des symptômes sur feuilles et sur fruits ressemblant à ceux du HLB ont été observés dans plusieurs vergers d'orangers près de la ville d'Araraquara, dans l'Etat de Sao Paulo. Quarante trois échantillons symptomatiques et 25 échantillons non symptomatiques de feuilles d'orangers de 5 fermes différentes ont été analysés pour la présence de *Liberibacter* du HLB par PCR en utilisant deux paires d'amorces spécifiques du HLB pour l'amplification de l'ADNr 16S et des gènes de protéines ribosomiques. Aucune amplification n'a été obtenue avec les 43 échantillons de feuilles symptomatiques. Tous les échantillons ont alors été analysés par PCR en utilisant des amorces universelles pour l'amplification de l'ADNr 16S bactérien. Tous les échantillons de feuilles symptomatiques, mais aucun des échantillons de feuilles non symptomatiques, ont donné le même ADNr 16S amplifié, indiquant la présence d'une bactérie dans les feuilles symptomatiques. Cet ADNr 16S a été cloné, séquencé et comparé avec ceux de *Ca. Liberibacter africanus* et *Ca. Liberibacter asiaticus*. Alors que les séquences des ADNr 16S des deux espèces de *Liberibacter* possèdent 98,4% d'identité, la séquence de l'ADNr 16S de la nouvelle bactérie ne présente que 96,1% d'identité avec celle de *Ca. Liberibacter asiaticus* et 95,9% avec celle de *Ca. Liberibacter africanus*. La séquence de l'ADNr 16S de la nouvelle bactérie a une structure secondaire en boucle caractéristique de la sous-division alpha des protéobactéries, et possède 10 signatures caractéristiques des alpha-protéobactéries, comme les *Liberibacter*. Pour ces raisons, la nouvelle bactérie est un *Liberibacter*, et est suffisamment différente phylogéniquement des *Liberibacter* connus pour former une nouvelle espèce, *Candidatus Liberibacter americanus*. Des amorces PCR spécifiques pour l'amplification de l'ADNr 16S de cette nouvelle espèce ont été développées. Elles ont permis de détecter *Candidatus Liberibacter americanus* dans 214 échantillons de feuilles symptomatiques provenant de 47 fermes d'agrumes dans 35 municipalités du Brésil.

O-32 CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE *PHYTOPHTHORA ALNI*, HYBRIDE INTERSPÉCIFIQUE RESPONSABLE D'UNE GRAVE MALADIE ÉMERGENTE SUR L'AULNE ET APPLICATION À LA DÉTECTION.

PASCAL FREY, RENAUD IOOS, CLAUDE HUSSON ET AXELLE ANDRIEUX.

INRA, rue d'Amance 54280 CHAMPENOUX, FRANCE

Depuis le début des années 1990, la population naturelle d'aulnes en Europe est menacée par l'apparition d'une nouvelle maladie causée par un *Phytophthora*. Ce dernier est capable de provoquer la mort d'un sujet adulte en moins de trois années. Il a été démontré que cet Oomycète, *Phytophthora alni*, est un hybride naturel entre deux espèces de *Phytophthora* encore mal définies. Il se décline en plusieurs variants, tous pathogènes sur aulne mais suffisamment différents sur les plans morphologique et génétique pour être aujourd'hui séparées en sous espèces : *P. alni subsp. alni*, *P. alni subsp. uniformis* et *P. alni subsp. multiformis*. S'agissant de la première maladie à *Phytophthora* sur l'aulne, cet hybride aurait la particularité de présenter une gamme d'hôtes qui serait différente de celle des espèces parentales. La lutte contre cet agent pathogène reste aujourd'hui uniquement prophylactique et consiste essentiellement à éviter son introduction dans des zones saines. Un bon outil de détection est donc indispensable afin de contrôler la qualité du matériel végétal avant sa plantation, mais aussi pour éventuellement détecter la présence du parasite dans l'eau ou le substrat de culture. Cet agent pathogène est relativement difficile à isoler sur milieu artificiel. Par ailleurs, cette technique reste peu pratique à mettre en œuvre pour des analyses de routine impliquant un grand nombre d'échantillons. Nous avons donc développé des outils de détection reposant sur la technique PCR. Nous avons défini trois couples d'amorces de PCR dérivés de SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions), spécifiques de l'hybride et qui permettent de détecter et discriminer les trois sous-espèces de *P. alni*. Ces outils moléculaires ont été validés avec succès pour la détection directe de *P. alni* dans différents substrats comme l'eau de rivière ou du sol infectés ainsi que directement sur des nécroses corticales d'aulne, sans plus avoir recours à une technique préliminaire de piégeage biologique ou d'isolement. Un témoin interne d'amplification a été construit et intégré directement dans le mélange réactionnel pour permettre de détecter les éventuelles substances inhibitrices dans les extraits d'ADN, sources de "faux négatifs". Ces outils de détection sont utilisés dans le cadre d'études sur l'épidémiologie de cette maladie émergente. La mise en évidence de marqueurs spécifiques de l'hybride dans des régions non codantes du génome n'a toutefois pas permis de préciser l'origine évolutive de ce parasite émergent. Afin de tenter de préciser à la fois l'identité des espèces parentales, la fréquence de l'évènement d'hybridation et "l'âge" relatif des différentes sous-espèces de *P. alni*, nous avons étudié le polymorphisme d'une série particulière de gènes chez ces hybrides.

O-33 LA SUBSTITUTION D'UN SEUL ACIDE AMINÉ SUFFIT AU RICE YELLOW MOTTLE SOBEMOVIRUS (RYMV) POUR CONTOURNER LA RÉSISTANCE ÉLEVÉE D'ORYZA SATIVA CULTIVAR

HÉBRARD E. , PINEL-GALZI A., SIRÉ C. ET FARGETTE D.

IRD, 911 av Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex

Le Rice yellow mottle sobemovirus (RYMV) constitue un frein majeur au développement de la riziculture sur le continent africain. Un nombre restreint de variétés de riz (en particulier la variété Gigante) présente une résistance élevée au RYMV sous contrôle d'un seul gène récessif *rymv-1* (2). Le déploiement de variétés introgressées dans les champs est envisagé à brève échéance. Les perspectives offertes par ces variétés seront directement fonction de la durabilité de leur résistance. Leur efficacité à long terme est conditionnée par la capacité du virus à contourner cette résistance. Des expériences d'évolution expérimentale ont permis d'observer l'émergence d'un variant virulent CI4* après 6 cycles d'inoculation en série sur plantes résistantes, à partir de l'isolat avirulent CI4 (1). Par comparaison de la séquence complète des isolats CI4 et CI4*, nous avons identifié une seule mutation codante en position 1729 associée au contournement de *rymv-1*. Un outil de détection de cette mutation basé sur la technique SNP (Single Nucleotide Polymorphism) a été mis au point et utilisé sur les plantes précédemment inoculées en série. La mutation 1729* n'est pas détectée sur plantes sensibles dans l'isolat CI4 avant confrontation avec les plantes résistantes. En revanche, elle est détectée dès le premier passage sur plantes résistantes alors qu'aucun symptôme n'est visible après un mois post-inoculation et ceci jusqu'au sixième passage. Le variant CI4* n'est pas contre-sélectionné après 4 passages sur plantes sensibles. D'autre part, seul CI4* est détecté, qu'il soit inoculé seul ou en mélange avec CI4, sur plantes résistantes. Pour sa validation, la mutation 1729* a été introduite par mutagenèse dirigée dans un clone infectieux CIa avirulent sur plantes résistantes. Le clone muté CIa* est infectieux sur plantes sensibles malgré une mutation artéfactuelle de l'ATG de l'ORF2b, ce qui montre que celui-ci n'est pas utilisé comme codon d'initiation. En effet, la protéine P2b est produite en fusion avec la protéine P2a après un décalage de la phase de lecture. Sur plantes résistantes, CIa* est virulent, la mutation 1729* est donc suffisante pour reproduire des symptômes de contournement. Les conséquences de ce contournement dans l'évaluation de la durabilité de la résistance élevée du riz Gigante au RYMV seront discutées et des hypothèses sur le rôle de la mutation 1729* dans le mécanisme de contournement seront envisagées.

1 Fargette, D., A. Pinel, O. Traoré, A. Ghesquière, and G. Konaté. 2002. Emergence of resistance-breaking isolates of Rice yellow mottle virus during serial inoculations. *European Journal of Plant Pathology* 108:585-591.

2. Ndjioudjop, M. N., L. Albar, D. Fargette, C. Fauquet, and A. Ghesquiere. 1999. The genetic basis of high resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivars of two cultivated rice species. *Plant Disease* 83:931-935.

O-34 VIRUS ÉMERGENTS SUR SOLANACÉES ET ÉVOLUTION DES CONCEPTS DE TAXONOMIE ET PHYLOGÉNIE

GEORGES MARCHOUX, BENOÎT MOURY, PATRICK GOGNALONS AND ANNE DALMON

INRA, Domaine St Maurice, BP 94 84143 MONTFAVET, FRANCE

Virus émergents sur Solanacées et évolution des concepts de taxonomie et phylogénie Georges Marchoux, Benoît Moury, Patrick Gognalons, Anne Dalmon* INRA, Unité de Pathologie végétale et LNPV*, BP 94, 84143 Montfavet Ces dernières décennies ont vu se développer de graves épidémies de virus émergents ou réémergents en Europe ou dans le monde sur Solanacées cultivées : tomate, piment, pomme de terre, pépino, aubergine, pétunia.... Selon les virus, les facteurs favorisant ces épidémies sont l'introduction et l'adaptation de certains vecteurs ou biotypes, la mondialisation du commerce et des échanges de matériel végétal, l'intensification des cultures, l'homogénéisation génétique des variétés, la rapide évolution des populations virales par mutation, recombinaisons et réassortiments. Des exemples illustrant différentes situations relativement récentes seront présentés. Des dispositions réglementaires visant à éviter la dissémination d'organismes nuisibles sont adoptées dans différents pays et au niveau européen. Parallèlement, l'organisation européenne de la protection des plantes (OEPP) établit des listes d'alerte concernant les parasites émergents dangereux pour les pays de l'UE. En 40 ans au niveau mondial, le nombre de virus pathogènes en conditions de cultures décrits sur Solanacées est passé de 47 à plus de 150 en l'an 2000 notamment en raison du développement des inventaires dans les pays tropicaux. Parallèlement, les concepts de la taxonomie ont profondément évolué. Les critères phénotypiques des taxons (gamme d'hôtes, symptomatologie, type de vecteurs, protection croisée, sérologie...) ont été complétés (voire remplacés) par les données intrinsèques des séquençages qui ont permis de préciser l'organisation et les modes d'expression des génomes. Ainsi chez les Solanacées, la diversification des virus comporte actuellement 13 familles et 32 genres reconnus par l'ICTV. Les comparaisons d'identité de séquences des gènes principaux ou du génome complet ont été utilisées pour distinguer les souches et les espèces virales en fonction de seuils arbitraires qui seront discutés. De nombreux arbres phylogénétiques représentant les parentés intraspécifiques ou interspécifiques voire intergéniques ont fleuri dans la littérature. Leur étude conduit à des schémas évolutifs qui peuvent être différents selon le gène considéré (capside ou polymérase le plus souvent) et semble indiquer que le « brassage » des gènes est un caractère « universel » dans l'évolution des phytovirus.

O-35 ECHELLES DE TEMPS ET D'ESPACE EN ÉPIDÉMIOLOGIE VÉGÉTALE

I. SACHE, S. SOUBEYRAND, J. CHADOEUF ET R FAIVRE

INRA, BP 01 78000 THIVERVAL-GRIGNON, FRANCE

La question de l'échelle d'observation est centrale en épidémiologie végétale car les composantes d'une épidémie peuvent être considérées à des échelles de temps et d'espace très différentes, du processus élémentaire intervenant quasi-instantanément sur un organe à la récurrence inter-annuelle des épidémies au sein d'un continent. L'échelle classique d'observation d'une épidémie est celle qui se prête le mieux à des expérimentations de terrain, c'est-à-dire celle de la parcelle agricole ou expérimentale, au sein de laquelle la progression d'une épidémie peut être suivie avec un luxe relatif de détails. Il reste alors à savoir si la caractérisation obtenue répond aux questions de bases concernant l'étude spatio-temporelle des épidémies, à savoir "quand, où, pourquoi et comment une épidémie se développe-t-elle ?". A partir d'expérimentations effectuées à l'échelle du foyer de maladie, de la parcelle et d'un groupe de petites parcelles, nous essaierons de montrer que chacun de ces dispositifs est en adéquation avec les questions pertinentes à une échelle donnée et, réciproquement, que toute question d'ordre épidémiologique doit être traitée à l'échelle la plus appropriée. La compréhension de l'épidémie dans sa globalité nécessite alors la réconciliation des échelles, puisqu'il est certainement illusoire d'espérer capturer la complexité d'une épidémie à l'aide d'un modèle unique indépendant des échelles de temps et d'espace. Nous considérerons une approche générale de modélisation déclinée à chacune des échelles, afin de faire ressortir l'information apportée par chacune des déclinaisons du modèle et d'analyser la cohérence de l'ensemble de l'information. La généralité de la démarche de modélisation et ses applications possibles à des questions d'ordre agronomique seront ensuite débattues.

O-36 FACTORS INFLUENCING PLANT DISEASE RESISTANCE GENE DURABILITYJAN E. LEACH¹, KIMBERLY WEBB^{1,2}, JIANFA BAI¹, AND CASIANA VERA CRUZ².¹Colorado State University, Ft. Collins, CO, 80537 USA;²Kansas State University, Manhattan, KS 66506; ³International Rice Research Institute, Philippines.

Understanding the factors that influence durability of plant disease resistance (*R*) genes is critical to predicting how long those genes will remain effective after deployment. Laboratory and field experiments demonstrated that one factor contributing to the durability of the rice bacterial blight *R* gene *Xa7* is the cost in pathogenic fitness associated with adaptation of the pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), to virulence. Adaptation to virulence on *Xa7* results from loss of pathogen effector (*avr*) gene function, and several, but not all, *Xoo avr* genes function both in avirulence (host recognition) and fitness (aggressiveness and persistence). However, after planting of rice with *Xa7* in field sites for 10 years, the structure of the pathogen population shifted to one with increasing virulence to rice with *Xa7* and increased overall aggressiveness of the population to rice with no *R* gene. Regardless, the *Xa7* gene remains highly effective, suggesting that factors in addition to fitness cost of the effector genes are important. Because environmental factors affect *R* gene function in other systems, we addressed if temperature might influence effectiveness of bacterial blight *R* genes. In the Philippines, two crops of rice are planted per year; one season is characterized by higher day/night temperatures than the other. Of four *R* genes tested, only *Xa7* functions to restrict disease more effectively at high than low temperature regimes. These data suggest that high temperature effects on the resistance gene *Xa7* may impose oscillating selection on the *Xoo* population, and, together with fitness costs to the pathogen, may positively impact durability of *Xa7* in the field.

O-37 DU CHAMP AU GÈNE ET DU GÈNE AU CHAMP : EXEMPLE DE L'ÉTUDE DU PATHOSYSTÈME *XANTHOMONAS* - MANIOC

VALÉRIE VERDIER

IRD-CNRS - Université de Perpignan, 52 avenue de Villeneuve 66860 PERPIGNAN, FRANCE

Le manioc constitue la source principale de l'alimentation humaine pour plus de 600 millions de personnes dans le monde. La bactériose du manioc (CBB) causée par *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) est présente dans toutes les régions de culture du manioc et entraîne de graves pertes de récolte et pertes de matériel végétal. C'est une bactérie à la fois épiphyte et vasculaire et son cycle se caractérise par l'alternance d'une phase parasitaire en saison des pluies et d'une phase de survie en saison sèche. Le mode de multiplication de la plante favorise considérablement la propagation de cette maladie. Les méthodes de lutte portent essentiellement sur des pratiques phytosanitaires et sont peu efficaces. L'utilisation de variétés résistantes reste le moyen le plus efficace pour lutter contre la bactériose. Au cours de ces dernières années, nous avons développé notre étude à la fois sur le terrain principalement en Amérique latine et au laboratoire. Nous avons prospecté et échantillonné sur le terrain dans différentes écozones, analysé les principaux facteurs pouvant jouer un rôle sur la structure des populations du pathogène et évalué les variétés de manioc pour la résistance à *Xam*. Nous avons développé des marqueurs moléculaires tant pour la caractérisation de la structure des populations de l'agent pathogène que pour l'étude du déterminisme génétique de la résistance. Des outils ont été également mis au point afin de permettre un diagnostic rapide de l'agent pathogène dans les tissus végétaux. Récemment, nous avons développé une approche génomique et ainsi caractérisé une large collection d'ESTs manioc. Cette collection constitue une ressource importante pour étudier différents aspects de l'interaction avec *Xam* et de manière plus générale de la biologie du manioc. Nous avons ensuite exploité cette ressource en construisant une puce à ADN constituée de 6000 gènes. Cette puce a été utilisée pour étudier la cinétique de réponse des gènes lors de l'infection par *Xam*. Cette analyse nous a permis d'identifier plusieurs gènes induits et réprimés lors de l'interaction avec *Xam* dont certains ont été validés par RT-PCR quantitative. Ces gènes représentent une ressource importante et sont potentiellement utilisables en amélioration variétale. Au cours de cet exposé, nous verrons comment l'ensemble de ces connaissances ainsi que les outils que nous avons développés contribuent à l'amélioration de la culture et au développement de nouvelles variétés.

O-38 UNE APPROCHE DE GÉNOMIQUE POUR LA CARACTÉRISATION D'UN ÉLICITEUR D'ALGUE VERTE

STÉPHANIE CLUZET, CARINE TORREGROSA, CHRISTOPHE JACQUET, CLAUDE LAFITTE, JOËLLE FOURNIER, LAURENCE MERCIER, SYLVIE SALAMAGNE, XAVIER BRIAND, MARIE-THÉRÈSE ESQUERRÉ-TUGAYÉ ET BERNARD DUMAS

CNRS-UPS, 24 ch de Borde Rouge BP17 Auzeville 31326 CASTANET -TOLOSAN, FRANCE

Les éliciteurs sont des molécules qui déclenchent chez les plantes des réponses de défense contre les agents pathogènes. Dans l'objectif de découvrir de nouvelles sources d'éliciteurs, un extrait enrichi en composés polysaccharidiques a été préparé à partir des algues vertes marines *Ulva* spp. et son activité élicitrice de défense a été établie sur la plante-modèle *Medicago truncatula*. L'infiltration de cet extrait dans les tissus végétaux ou sa pulvérisation sur les feuilles entraîne l'induction de l'expression d'un gène marqueur de défense PR10 sans provoquer de nécroses. La pulvérisation d'une solution à 500 μ g.mL⁻¹ est suffisante pour obtenir une induction maximale de PR10 deux jours après traitement. L'utilisation d'un filtre d'ADNc enrichi en gènes potentiellement impliqués dans la défense végétale a permis de suivre l'expression de 152 gènes après un ou deux traitements consécutifs. Un large éventail de transcripts relatifs à la défense est induit, notamment les gènes impliqués dans la biosynthèse des phytoalexines, les gènes codant des protéines impliquées dans la défense et des protéines de la paroi cellulaire. Toutefois l'expression des gènes du métabolisme primaire ne change pas de manière significative. De plus, l'induction des gènes de défense est corrélée à une protection des plantes contre une infection ultérieure par le champignon phytopathogène *Colletotrichum trifolii*. L'efficacité de cet extrait est en cours d'évaluation dans les conditions de plein champ.

Cluzet S., Torregrosa C., Jacquet C., Lafitte C., Fournier J., Mercier L., Salamagne S., Briand X., Esquerré-Tugayé M.T. et Bernard Dumas. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from the green algae *Ulva* spp. 2004. *Plant, Cell and Environment*, 27(7): 917-928

O-39 CARACTÉRISATION DE LA COLLECTION EUROPÉENNE DE VARIÉTÉS DE LUZERNE POUR LA RÉSISTANCE AU *VERTICILLIUM ALBO-ATRUM* ET A *DITYLENCHUS DIPSACI*

V. MOLINERO-DEMILLY¹, B. MONTEGANO², C. GIROULT¹, B. JULIER³, M. GUENARD¹, V. GENSOLELLEN²

1 GEVES-SNES, rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé cedex 01 ;

2 GEVES, La valette, 711, rue Jean-François Breton, F34090, Montpellier, France ;

3 INRA Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes, 86600 Lusignan, France.

Pour être commercialisée, une variété doit être inscrite à un catalogue officiel national ce qui lui donne également accès au catalogue européen. En France, le Comité Technique Permanent de la Sélection confie au GEVES l'étude des variétés en demande d'inscription. Il s'agit, en utilisant un ensemble de caractères, d'une part de vérifier que les variétés présentées par le sélectionneur sont distinctes des variétés déjà inscrites et suffisamment uniformes (épreuve DHS pour Distinction, Homogénéité et Stabilité), et d'autre part de tester le progrès agronomique qu'elles apportent (épreuve VAT, Valeur Agronomique et Technologique). Comme la luzerne est une espèce allogame et tétraploïde et que les cultivars issus de la sélection sont des variétés synthétiques, la variance intra-variétale est élevée, parfois même équivalente à la variance inter-variétale, ce qui complexifie l'étude DHS. Dans ce contexte et en complément de caractères morpho-physiologiques, dans la mesure où un progrès génétique a été enregistré pour la résistance à un champignon, *Verticillium albo-atrum* et à un nématode, *Ditylenchus dipsaci*, nous avons pensé que ces résistances pourraient être utilisées comme critères supplémentaires pour aider à la distinction des variétés. Nous avons donc évalué le niveau de résistance d'une partie de la collection des variétés européennes de luzerne vis-à-vis de ces deux pathogènes, en mettant au point une méthode pour pouvoir incrémenter cette base de données au cours des années. Ce programme a été financé par le Ministère de l'Agriculture dans le cadre de l'appui méthodologique aux sections du CTPS, faisant intervenir cinq entreprises privées de sélection, l'INRA et le GEVES. Parmi la collection européenne de variétés de luzerne, 45 variétés ont été évaluées pour leur résistance au *Verticillium albo-atrum* et 66 variétés pour leur résistance au *Ditylenchus dipsaci*. Une série de tests a servi à établir une note de référence pour des variétés témoins. Ces variétés témoins, incluses dans les tests impliquant les variétés de la collection, permettent d'une part de valider les tests, et d'autre part de calculer une note 'fiabilisée' pour chaque variété, indépendante du test et calée sur la valeur des témoins. Pour les deux pathogènes, une large gamme de variation a été observée entre variétés, indiquant le pouvoir discriminant de ces caractères de résistance.

POSTERS

Session A

Approches cellulaires des interactions plantes-microorganismes

P-1 INVESTIGATING THE ROLE OF MITOSIS IN APPRESSORIUM DEVELOPMENT BY MAGNAPORTHE GRISEA.

Claire Veneault-Fourrey and Nicholas J. Talbot

School of Biological Sciences, University of Exeter, Washington Singer Laboratories, Perry Road, Exeter, EX4 4QG, UK

The rice blast fungus *Magnaporthe grisea* elaborates a specialised infection structure called an appressorium in order to infect rice leaves. Previously, it was reported that mitosis occurs in the germ tube prior to appressorium development (1), however, little emphasis has been placed on investigating the importance of this event. A *Magnaporthe* strain carrying the GFP gene fused to the C-terminus of the histone E11-encoding gene hH1 from *Neurospora crassa* under the CCG1 constitutive promoter displays fluorescent nuclei (2, kindly provided by Dr Jin-Rong Xu). This strain allowed us to investigate in details the in vivo behaviour of the three conidial nuclei during appressorium development. Mitosis occurs in the germ tube during extension and hooking (between 4 and 6 hours after inoculation). The two daughter nuclei migrate, one to the appressoria and the other into conidium. Then the conidium undergoes nuclear degeneration between 12 and 15 hours after inoculation. After appressorium differentiation, mitosis occurs in the penetration peg and in the colonisation hyphae. Benomyl (20 mg/ml) inhibit mitosis and development of full melanised appressoria suggesting that completion of mitosis is required for complete appressorium development. A DNA synthesis inhibitor hydroxyurea (50 mM) arrests mitosis and prevents appressorium formation. HU blocks mitosis when it is applied between 4 and 6 hours but not when it is added after 6 hours. This result suggests that synthesis of DNA occurs between 4 and 6 hours. The next step of the project is to determine the role of the S-phase and mitotic checkpoint in the regulation of appressorium development in *M. grisea*. Cell cycle and its control are well studied in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. In particular, the two genes NimA and BimD have been shown to control entry into mitosis and G1/S transition, respectively. Orthologues in *M. grisea* have been cloned and their functional analyses are underway. Main results will be presented. (1) Bourett and Howard, 1990, Can. J. Bot. 68, 329-342 (2) Folco et al., 2003, Euk. Cell, 2 (2), 341-350.

Session B

Pouvoir pathogène

P-2 PRODUCTION DE MUTANTS NON MARQUÉS CHEZ *SPIROPLASMA CITRI*: UTILISATION DU SYSTÈME TnpR/RES POUR L'OBTENTION D'UN MUTANT NON MARQUÉ INCAPABLE DE DÉGRADER L'ARGININE.

SYBILLE DURET-NURBEL ET JOËL RENAUDIN

UMR Génomique Développement et Pouvoir Pathogène, INRA-Université Victor Segalen Bordeaux2, IBVM, Centre INRA de Bordeaux, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex.

Les mollicutes phytopathogènes, phytoplasmes et spiroplasmes, sont responsables de nombreuses maladies affectant les plantes ornementales, les cultures maraîchères, les arbres fruitiers et la vigne. Ils sont localisés dans les tubes criblés du phloème et sont transmis de plante à plante par des insectes vecteurs. Contrairement aux phytoplasmes, les spiroplasmes sont disponibles en culture. De ce fait, *Spiroplasma citri* est devenu un modèle privilégié pour l'étude des mollicutes phytopathogènes. Des outils génétiques spécifiques ont été développés et la recherche des déterminants génétiques de la transmission et du pouvoir pathogène a été entreprise par une approche de génétique inverse. Chez *S. citri*, l'inactivation de gènes par recombinaison homologue repose sur l'utilisation d'un seul marqueur de sélection efficace, le gène *tetM* qui confère la résistance à la tétracycline. L'intégration de ce marqueur dans le chromosome exclut de fait son utilisation pour toute manipulation génétique ultérieure. Pour contourner cette difficulté, nous avons adapté une méthodologie qui cumule les avantages d'utiliser un marqueur de résistance à un antibiotique pour la disruption de gène et la possibilité d'exciser ce marqueur du chromosome pour obtenir un mutant non marqué. Le système TnpR/res du transposon *d'E. coli* a été utilisé pour obtenir un mutant de *S. citri* incapable d'utiliser l'arginine. Dans ce système, la résolvasse TnpR reconnaît des séquences spécifiques (séquences res) et excise l'ADN compris entre ces deux séquences res. L'opéron *arcABDC* de *S. citri* a été inactivé en disruptant le gène *arcA* (codant l'arginine déiminase) par recombinaison homologue. Le plasmide d'inactivation pSD61 a été construit en combinant l'*oriC* de *S. citri*, un fragment interne du gène *arcA* et le marqueur de résistance à la tétracycline (*tetM*). Les séquences res ont été introduites de part et d'autre du gène *tetM* pour permettre son excision. Après transformation de *S. citri* GII-3, l'intégration du plasmide par recombinaison *via* un seul crossing-over au niveau du gène *arcA* s'est traduite par l'obtention du mutant GII3-arg1, incapable de métaboliser l'arginine et résistant à la tétracycline. Pour exciser le marqueur *tetM*, la résolvasse a été apporté en trans par transformation du mutant avec un plasmide replicatif portant le gène *tnpR* sous la dépendance d'un promoteur de spiroplasma. L'obtention de transformants sensibles à la tétracycline et dépourvus de gène *tetM* montre que le système TnpR/res fonctionne chez *S. citri*, permettant la production de mutants non marqués. Ces travaux permettent d'envisager non seulement la production de mutants multiples, mais également l'obtention de mutant par délétion de certaines régions du génome. La disponibilité de tels mutants devraient faciliter l'analyse fonctionnelle du génome de *S. citri*.

P-3 CARACTÉRISATION DE DSPA, EFFECTEUR DE TYPE III NÉCESSAIRE AU POUVOIR PATHOGÈNE D'*ERWINIA AMYLOVORA*.

BOUREAU T., EL MAAROUF H., BRISSET MN., BARNY MA.

Laboratoire des Interactions Plantes Pathogènes, UMR217 INAPG/INRA/UPMC Paris VI, 16 rue Claude Bernard 75005 PARIS

Erwinia amylovora est l'agent pathogène responsable du feu bactérien des Maloïdées (pommier, poirier). Son pouvoir pathogène nécessite un système de sécrétion de type III (TTSS) fonctionnel. Le TTSS décrit chez les différentes bactéries pathogènes, tant animales que végétales, permet l'injection d'effecteurs bactériens impliqués dans le pouvoir pathogène dans la cellule eucaryote cible. Chez *Erwinia amylovora*, DspA est une protéine de 198 kDa nécessaire au pouvoir pathogène, sécrétée *in vitro* par le TTSS (Gaudriault et al., 1997). *In planta*, par immunocytochimie couplée à des méthodes de microscopie (microscopie confocale, et électronique à transmission), DspA a été détectée dans l'apoplaste, montrant que DspA est sécrétée. Cependant, lorsque dspA est exprimé directement dans la cellule végétale via *Agrobacterium tumefaciens*, l'expression transitoire de dspA aboutit à une nécrose sur feuilles de pommier (hôte) et de tabac (non-hôte). Ce dernier résultat suggère que DspA est également injectée dans la cellule de la plante via le TTSS pour atteindre sa cible. Afin de quantifier l'importance de DspA dans les nécroses induites lors des interactions entre *Erwinia amylovora* et le pommier (plante hôte) et le tabac (plante non-hôte), les fuites d'électrolytes ont été mesurées en réponse à l'infection. En réponse à la souche sauvage d'*E. amylovora*, les fuites d'électrolytes induites sur pommier et tabac sont d'intensité et de rapidité similaires. Les fuites d'électrolytes induites par un mutant dspA sont abolies sur pommier et réduites des deux tiers sur tabac par rapport à celles observées en réponse à la souche sauvage, confirmant l'effet majeur de DspA dans l'induction des nécroses observées après inoculation d'*Erwinia amylovora* sur pommier ou sur tabac. Pour caractériser l'effet de DspA sur la physiologie de la cellule, nous avons comparé par cDNA-AFLP les réponses du tabac à l'expression transitoire de dspA et de gus (utilisé ici comme témoin négatif). Afin d'identifier des messagers différentiellement exprimés entre les réponses à l'expression transitoire de dspA et de gus lors de chaque étapes de l'interaction (précoces et tardives), les ARN ont été isolés toutes les 6h à partir de 12h et jusqu'à 36h après agroinfection. 14 fragments disparaissent et 69 fragments apparaissent en réponse à l'expression transitoire de dspA. Ces fragments ont été isolés et clonés, et 35 d'entre eux ont été séquencés. Les résultats obtenus suggèrent que DspA induit l'expression d'un programme de mort cellulaire dans la cellule végétale. Par ailleurs, l'expression du gène pr1, marqueur des réactions de défense dépendantes de la voie de l'acide salicylique (SA) a été étudiée. De manière surprenante, l'expression transitoire de dspA inhibe l'expression de pr1. L'impact de DspA sur la physiologie de la cellule végétale est donc double : DspA induit la mort cellulaire de la cellule végétale et provoque la répression de l'expression de pr1.

P-4 CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE FAMILLE D'EFFECTEURS DE PATHOGÉNIE DE TYPE III DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* ET IDENTIFICATION DE LEURS CIBLES VÉGÉTALES.

ANGOT A., PEETERS N. M., CUNNAC S., SIDI MAMMAR B., BOUCHER C. A. ET GENIN S.

LIPM, INRA-CNRS, chemin de borde rouge BP27 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX, FRANCE

Le Système de Sécrétion de Type III (SSTT) constitue l'un des principaux déterminants de pathogénicité de la bactérie *Ralstonia solanacearum*. Complexe protéique synthétisé lors de l'infection d'une plante hôte, le SSTT permet d'injecter, directement dans le cytoplasme des cellules végétales, des protéines bactériennes spécifiques : les effecteurs de pathogénie. L'identification à l'échelle génomique des effecteurs transitant par le SSTT a été réalisée au laboratoire. Au sein du vaste répertoire ainsi constitué, l'étude des homologues de séquences a permis de révéler l'existence d'une famille de 7 gènes contenant des répétitions LRR atypiques : la famille GALA. L'expression de 6 des 7 gènes GALA est régulée par HrpB qui contrôle la transcription de l'ensemble des gènes codant pour la machinerie du SSTT ainsi que d'autres gènes d'effecteurs. D'autre part, l'injection dans la cellule végétale par le SSTT a été démontrée pour la protéine GALA6, confirmant ainsi expérimentalement son statut d'effecteur. Outre des répétitions riches en leucine présentes en C-terminal de leurs séquences, les protéines GALA possèdent en N-terminal un motif F-box. La présence de ces deux types de motifs leur confèrent une structure particulière, caractéristique des protéines F-Box eucaryotes impliquées dans la dégradation spécifique des protéines via le complexe SCF et le protéasome 26S. Un criblage d'une banque d'*Arabidopsis thaliana* par la méthodologie double-hybride dans la levure a été réalisé pour GALA6 et a révélé une interaction avec la protéine ASK1 ; élément central du complexe SCF chez *A. thaliana*. L'analyse fine de l'interaction entre les deux partenaires et la spécificité d'interaction entre ASK1 et ses homologues et les différentes protéines GALA sera présentée.

P-5 L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* RÉVÈLE UN MÉCANISME INTÉGRÉ D'EXPRESSION DES GÈNES HRP ET D'AUTRES DÉTERMINANTS DE PATHOGÉNIE.

MARC VALLS, ALESSANDRA OCCHIALINI, THOMAS LANDES, STÉPHANE GENIN ET CHRISTIAN BOUCHER

LIPM, UMR CNRS-INRA, chemin de borde-rouge BP27 31326 CASTANET TOLOSAN, FRANCE

Le rôle clé joué par les gènes *hrp* dans le déterminisme de la pathogénie de *R. solanacearum*, agent responsable du flétrissement bactérien des Solanacées est bien établi. Ces gènes codent pour un système de sécrétion de type III (TTSS) qui permet l'injection de protéines bactériennes dites effecteurs, dans les cellules végétales. Nous avons montré que la transcription des gènes du TTSS, ainsi que de ceux des effecteurs associés est sous la dépendance des deux activateurs transcriptionnels *hrpG* et *hrpB*, le premier contrôlant sur la transcription du second qui active lui même les gènes cibles. A la suite de l'annotation du génome complet de *R. solanacearum*, nous avons développé une puce à ADN basée sur l'utilisation d'oligonucléotides de 70-mers représentatifs de la quasi totalité des gènes présents dans la souche GMI1000. Cette puce a été utilisée pour conduire une analyse des gènes qui sont transcrits sous la dépendance des activateurs HrpB et HrpG, par comparaison du transcriptome de la souche sauvage et d'un mutant dans chacun de ces deux gènes. Ces travaux ont permis de démontrer que les deux gènes agissent à la fois positivement et négativement sur l'expression génique. Outre l'identification de 26 nouveaux candidats effecteurs, les résultats obtenus ont permis d'établir que le régulon *hrpB* s'étend au delà des gènes codant pour le TTSS et pour les effecteurs qui lui sont associés pour inclure des gènes qui gouvernent la chemotaxie, la biosynthèse et /ou le catabolisme de différentes molécules de bas poids moléculaire parmi lesquelles figurent plusieurs sidérophores. L'analyse du transcriptome du mutant *hrpG* confirme ces résultats et révèle de plus l'existence d'un groupe de gènes régulés spécifiquement par *hrpG* et responsables notamment de la synthèse de plusieurs enzymes hydrolytiques, des enzymes impliquées dans la synthèse d'hormones végétales et un ensemble de transporteurs trans-membranaires. Ces résultats suggèrent que le produit du gène *hrpG* jouerait un rôle de régulateur central impliqué dans le contrôle du basculement physiologique associé au passage de la vie saprophytique dans l'environnement vers la vie parasitaire dans la plante. Des expériences sont en cours afin de tenter de valider le rôle des nouveaux gènes identifiés dans le processus de pathogénèse.

P-6 RÉSEAUX DE RÉGULATION IMPLIQUÉS DANS LE POUVOIR PATHOGÈNE D'ERWINIA CHRYSANTHEMI

VAN GIJSEGEM FRÉDÉRIQUE¹, STÉPHANE GAUBERT¹, DOMINIQUE EXPERT¹, WILLIAM NASSER² ET SYLVIE REVERCHON²

*1*Laboratoire Interactions Plantes-Pathogènes, UMR 217 INRA/INA P-G/UPMC, 75005 Paris, France;

2 Unité de Microbiologie et Génétique, CNRS UMR5122, 69622 Villeurbanne cedex
6 rue Claude Bernard 75005 PARIS, FRANCE

Erwinia chrysanthemi est une entérobactérie phytopathogène à large spectre d'hôte provoquant des pourritures humides sur de nombreuses plantes à la fois au champ et en conservation. L'interaction d'*Erwinia chrysanthemi* avec ses plantes hôtes est un processus complexe qui implique de nombreux facteurs de pathogénie. La production des symptômes de pourriture humide est principalement due à la synthèse et la sécrétion d'une batterie d'enzymes, spécialement des pectinases, capables de dégrader les parois végétales. Cependant, d'autres facteurs essentiels à une colonisation efficace des plantes ont été identifiés comme l'intégrité de l'enveloppe bactérienne, des systèmes d'acquisition du fer ou la résistance à différents stress chimiques et environnementaux rencontrés à l'intérieur des plantes. La production des différents facteurs de pathogénie est finement contrôlée par des réseaux de régulation complexes et interconnectés qui impliquent des signaux provenant soit directement de la plante, soit des conditions environnementales rencontrées in planta. Le devenir de l'interaction est tributaire de ces régulations car, après pénétration dans la plante hôte, les bactéries résident généralement de manière latente dans les espaces intercellulaires sans provoquer de symptômes et la maladie ne se déclare que lorsque les conditions environnementales sont favorables à la multiplication intensive de la bactérie et à la production des enzymes dégradatifs. Nos objectifs sont d'identifier les réseaux de régulation bactériens importants dans les interactions avec les plantes et de comprendre les interconnexions entre ces réseaux qui permettent la production coordonnée des différents facteurs de pathogénie pour mener à la maladie. L'annotation du génome d'*E. chrysanthemi* a permis de dresser un catalogue des différents régulateurs présents chez la bactérie. Plus de 300 régulateurs ont été répertoriés. En plus de la dizaine de régulateurs déjà connus pour être impliqués dans la régulation de facteurs de virulence, les systèmes de régulation importants dans la virulence des autres *Erwinias* phytopathogènes sont également présents chez *E. chrysanthemi*. D'autre part, une cinquantaine de régulateurs présentent de fortes similarités uniquement avec des protéines présentes chez des bactéries associées aux plantes suggérant qu'ils pourraient jouer un rôle dans les interactions plantes-bactéries. Une approche de mutagenèse systématique de ces régulateurs est en cours pour identifier lesquels parmi eux jouent un rôle dans les interactions avec les plantes. L'analyse de la régulation de la pectinolyse in vitro a essentiellement permis d'identifier des régulateurs négatifs. Des mutants affectés dans les régulateurs globaux PecS et PecT sont clairement hyperagressifs alors qu'une mutation dans le gène *kdgR*, qui régule spécifiquement les voies de dégradation de la pectine et de sucres apparentés, n'a qu'un faible effet. L'analyse génomique a permis d'identifier 3 systèmes de régulation par quorum-sensing, deux de ces systèmes sont clairement impliqués dans le pouvoir pathogène. Enfin, bien qu'une mutation inactivant le système de sécrétion de type III Hrp n'a qu'un faible effet sur le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi*, un mutant de régulation HrpL est fortement affecté. Les interconnexions entre ces différentes voies de régulation seront étudiées par l'analyse du pouvoir pathogène de doubles mutants.

P-7 SPORULATION ET INSTABILITÉ MITOTIQUE DE TRANSFORMANTS DE *PHYTOPHTHORA PARASITICA*

ELODIE GAULIN, NATHALIE HAGET, FRANÇOIS VILLALBA, MOUSTAFA KHATIB, CORENTIN HERBERT, MARIE-THÉRÈSE ESQUERRE-TUGAYE, MARTINA RICKAUER, ARNAUD BOTTIN

UMR CNRS-UPS, 24, Chemin de Borde-Rouge, BP17, AUZEVILLE 31326 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

Pour étudier l'implication de gènes candidats dans le pouvoir pathogène de champignons filamenteux, il est nécessaire de maîtriser l'outil de transformation pour des approches de génétique inverse. La transformation génétique des Oomycètes a été réalisée chez un petit nombre d'espèces, et a été étudiée en détail chez *Phytophthora infestans* seulement. Pour étudier la fonction de l'éliciteur CBEL de *Phytophthora parasitica*, la transformation génétique de cette espèce a été réalisée (1), des souches ont été générées chez lesquelles l'expression du gène de CBEL est inactivée, et leur phénotype a été étudié (2). A l'occasion de cette analyse, il a été noté que les transformants de *P. parasitica* étaient affectés dans leur capacité de sporulation. Nous présentons ici une étude de la sporulation et de la stabilité de transformants de *P. parasitica* résistants à l'hygromycine ou à la généticine. Nous montrons que ces antibiotiques inhibent partiellement ou complètement la production de zoospores. Des transformants primaires résistants à l'un ou l'autre de ces antibiotiques, ainsi que leurs descendances résistantes issues de zoospores isolées, génèrent à haute fréquence des colonies ayant perdu le caractère de résistance. La perte du phénotype de résistance est corrélée à celle du gène de résistance *hph* codant l'hygromycine phosphotransférase ou *nptII* codant la néomycine phosphotransférase. C'est la première fois qu'une telle instabilité mitotique est rapportée chez des transformants de *Phytophthora*, ce qui suggère que le destin de l'ADN exogène introduit par transformation génétique peut varier significativement au sein du genre. En revanche, chez les transformants chez lesquels l'expression du gène de CBEL est inactivée, la perte de la résistance à l'hygromycine n'est pas accompagnée d'une restauration de l'expression de CBEL, ce qui indique que, comme chez *P. infestans*, le "silencing" est irréversible chez *P. parasitica*. Ainsi, malgré l'instabilité des séquences exogènes chez *P. parasitica*, l'approche de génétique inverse est possible chez cet organisme.

1 - Bottin A, Larche L, Villalba F, Gaulin E, Esquerré-Tugayé MT et Rickauer M (1999). Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica nicotianae*. FEMS Microbiology Letters 176, 51-56.

2 - Gaulin E, Jauneau A, Villalba F, Rickauer M, Esquerré-Tugayé MT et Bottin A (2002). The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. J. Cell Sci. 115, 4565-4575.

P-8 RÔLE DE LA RÉGULATION PH DANS LE PROCESSUS INFECTIEUX DE COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM, CHAMPIGNON RESPONSABLE DE L'ANTHRACNOSE DU HARICOT COMMUN

MARCOS ANTONIO SOARES^{1,2}, RICHARD LAUGE¹, MARISA VIEIRA QUEIROZ² ET THIERRY LANGIN¹

1 IBP, Université Paris-Sud 91405 ORSAY, France

2

Les champignons se caractérisent par leur capacité à coloniser des milieux très variés. Cette grande souplesse « adaptative » repose sur l'existence, chez ces microorganismes, de « systèmes senseurs » des variations des conditions environnementales. La régulation par les variations du pH extracellulaire ou environnemental a été particulièrement bien étudiée chez le champignon saprophyte *Aspergillus nidulans*. Ces études ont permis de caractériser les bases génétiques et moléculaires de cette régulation et de montrer le rôle clef joué par les gènes *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF* et *palH* : PACC est un facteur de transcription, alors que les gènes *pal* codent des composantes de la voie de transduction spécifique du signal pH. L'organisation de ce système de régulation par le pH a depuis été montrée comme étant très conservé chez les champignons Ascomycètes. La colonisation des tissus végétaux par des champignons phytopathogènes va se traduire par la différenciation d'un nombre plus ou moins important de structures spécifiques et par l'adaptation de leur mode trophique. La coordination dans l'espace et dans le temps de ce processus complexe repose la perception par l'agent pathogène de signaux plus ou moins spécifiques. Ainsi, les variations de pH extracellulaires, rencontrées par le champignon pathogène au cours de la colonisation des tissus végétaux, peuvent représenter un des signaux clefs du contrôle de ce processus in planta. De plus, des études récentes ont démontré que certains champignons phytopathogènes (*Sclerotinia sclerotiorum* et *Colletotrichum gloeosporioides*) ou entomopathogènes (*Metarrhizium anisopliae*) étaient capables de modifier directement le pH des tissus végétaux colonisés. Le champignon *Colletotrichum lindemuthianum* est l'agent responsable de l'anthracnose chez le haricot commun, *Phaseolus vulgaris*. Son cycle infectieux est de type hémibiotrophe. Il se caractérise par la mise en place successive de structures d'infection spécifiques : appressorium, vésicule d'infection, hyphes primaires et hyphes invasives ou secondaires. Notre objectif est de démontrer l'importance de la régulation pH dans le contrôle du processus infectieux de *C. lindemuthianum*. Pour cela, nous avons isolé les gènes orthologues de *pacC*, *palA* et *palF* chez *C. lindemuthianum*, et analysé leur expression in vitro et au cours d'une cinétique d'infection. L'analyse phénotypique des mutants correspondants est en cours.

P-9 CHARACTERIZATION AND ROLE OF SULFUR METABOLISM IN PHYTOPATHOGENIC FUNGI *MAGNAPORTHE GRISEA* DURING THE INFECTION PROCESS

SAINT-MACARY M.E., BEAUREPAIRE A., GAGEY M.J., BARBISAN C., LEBRUN M.H., DROUX M.

Bayer Crop Science-CNRS, 14-20, rue Pierre Baizet 69009 LYON, FRANCE

Among plant pathogens, fungi are the most widespread and destructives. Nutritional needs of pathogenic fungi during interaction with their host remain poorly described, although some investigations have been undertaken on nitrogen and carbon assimilation (Solomon et al., 2003). Recent studies suggest that pathogenic fungi need sulfur micronutrient during the infection step. So sulfur metabolism is of interest as a target for novel antifungal drugs (Fritz et al., 2003). Sulfur pathway in filamentous fungi appears complex and particular. This pathway includes both genes corresponding to the described pathways of plant and yeast. In first, sulfate is assimilated and reduced through the common pathway for all autotrophic organisms that is composed of the activation and reduction steps. Then, reduced sulfur is incorporated in two amino acids, cysteine and methionine. In these final steps, the filamentous fungi catalyzed both the interconversion of homocysteine (the sulfur precursor for methionine synthesis) and cysteine by the direct and the reverse transsulfuration pathways. Methionine synthesis from cysteine involves two enzymes of the direct transsulfuration pathway, cystathionine gamma-synthase (CGS) and cystathionine beta-lyase (CBL) followed by the methylation step. Cysteine synthesis from homocysteine also uses two enzymes of the reverse transsulfuration, cystathionine beta-synthase (CBS) and cystathionine gamma-lyase (CGL). As a model, studies on sulfur metabolism in the phytopathogenic fungi *Magnaporthe grisea* would allow understanding of the role of this pathway during fungal development on planta. Previous works reported that sulfur amino acids biosynthesis was essential in the pathogenicity of *M. grisea* (Balhadère et al., 1999). The aim of our work is to identify genes and to highlight the role of direct and reverse transsulfuration pathway in the phytopathogenic model, *M. grisea*. Most of the sulfur genes involved in these sequences were identified from the available entire genome of this pathogenic rice blast fungus. To attempt our objective, on the one hand, we use a molecular and biochemical characterization of transsulfuration enzymes and, on the other hand, we create knock out mutants to elucidate the physiological role of these genes. Our first investigations were performed with one enzyme involved in the reverse transsulfuration pathway, the cystathionine gamma-lyase, and one involved in direct pathway, the cystathionine gamma-synthase. We also undertook the analysis of the methionine synthase involved in the methylation step of homocysteine. Similar approaches are under way for the two last enzymes of the transsulfuration pathway, cystathionine beta-lyase and cystathionine beta-synthase. In a long term, the aim is to establish the role of the sulfur network in the interaction between the plant and the fungus, the sulfur pathway in plant being now identified (Droux, 2004).

Balhadère P.V. *et al.* (1999), *Mol Plant-Microbe*, 12: 129-142.

Droux M. (2004), *Photosynthesis research*, 79: 3331-3348.

Fritz R. *et al.* (2003), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77: 54-65.

Solomon P. *et al.* (2003), *Mol. Plant. Pathol*, 4: 203-210.

P-10 FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE FUNGAL TETRASPANIN PLS1 DURING RICE INFECTION BY *MAGNAPORTHE GRISEA*.

LAMBOU K., FARGEIX C., CATUSSE J., GOURGUES M., COTTIER F. AND LEBRUN M.H.

Bayer cropscience-CNRS, 14-20 rue Pierre Baizet, BP9163 69263 LYON, FRANCE

The non-pathogenic mutant punchless from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* is unable to invade its host leaves. This invasion process requires the differentiation of a fungal cell, the appressorium, specialized in the penetration of the pathogen into host leaves. The mutant punchless differentiates appressoria that are non-functional, as they cannot direct the penetration of the fungus into host leaves. The gene inactivated in this mutant encodes a putative integral membrane protein of 225 AA (Pls1) that exhibits classical features of animal tetraspanins. Genes orthologous to PLS1 were identified in other fungi such as *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium graminearum* and *Neurospora crassa* defining a new tetraspanin family with highly conserved domains. Deletion of PLS1 orthologs in the plant pathogenic fungi *B. cinerea* (C. Levis, A. Simon, PMDV, INRA, France) and *C. lindemuthianum* (C. Veneault, D. Parisot, R. Lauge, T. Langin, IBP, CNRS-UPS-INRA, France) leads to non-pathogenic mutants. These mutants have the same defect as *M. grisea* PLS1 deletion mutant, as they differentiate appressoria unable to direct fungal penetration into host plants. These results suggest that fungal tetraspanins control a conserved appressorial function essential for the penetration of fungi into host leaves. Amino acids from domains conserved among fungal tetraspanins were modified by site-directed mutagenesis in *M. grisea* Pls1. The functionality of these mutant proteins was assessed by complementation of the *M. grisea* non-pathogenic PLS1 deletion mutant. The four cysteines from Pls1 ECL2 and the C-terminus tail are required for Pls1 function. Pls1 is only expressed in appressoria and its Pls1-GFP fusion protein is mainly localized in the vacuoles of this fungal cell. Comparison of genome wide expression profiles of wild type and PLS1 deletion mutant appressoria are currently used to identify the downstream targets of Pls1.

P-11 L'HISTIDINE-KINASE BCOS1 EST IMPLIQUÉE DANS LA FITNESS ET LA VIRULENCE DE *BOTRYTIS CINEREA*

MURIEL VIAUD, SABINE FILLINGER, WEIWEI LIU, JAI SANTOSH POLEPALLI, PIERRE LEROUX ET LAURENT LEGENDRE

INRA, Route de Saint-Cyr 78026 VERSAILLES CEDEX, FRANCE

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise, cause d'importantes pertes sur plus de 200 espèces végétales. L'utilisation de fongicides reste le principal moyen de lutte efficace contre cette maladie. Cependant, l'utilisation d'anti-botrytis de type dicarboximides a entraîné l'apparition de résistance (ImiR) au champ. Des isolats *ImiR* du laboratoire présentent en plus une résistance aux phénylpyrroles et une osmosensibilité, mais ils n'ont jamais été détectés dans la nature. La plupart des mutations *ImiR* affectent l'histidine kinase BcOS1. Afin de mieux comprendre le rôle de ce gène, nous avons entrepris une étude détaillée du mutant d'inactivation (BcOS1). Des mutants *Bcos1* montrent une résistance aux dicarboximides, phénylpyrroles et une sensibilité au stress osmotique. Mais ils ne sont pas sensibles à d'autres conditions de stress. Par contre, nous avons observé une forte réduction de la sporulation dans toutes les conditions, ainsi que du pouvoir pathogène chez ces mutants *Bcos1* par rapport à la souche parentale. Ces résultats suggèrent un rôle de l'histidine kinase BcOS1, en plus de la résistance à certains fongicides, dans la réponse au stress osmotique, le développement et dans le processus infectieux de *B. cinerea*. La cascade de signalisation dépendant de BcOS1 est vraisemblablement homologue à la voie HOG (High Osmolarity Glycerol) de *Saccharomyces cerevisiae*. Mais au contraire de la localisation de l'histidine kinase senseur Sln1 de la levure, nos résultats préliminaires d'une fusion BcOS1-GFP montrent une localisation cytoplasmique de cette histidine kinase suggérant des différences dans le fonctionnement des kinases senseurs entre ces deux organismes.

P-12 ANALYSE FONCTIONNELLE DE CLTA1, FACTEUR DE TRANSCRIPTION DE TYPE ZN2C6 À LA PATHOGÉNIE ESSENTIEL DE *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM*.

EUGÉNIE CHAROIN-BARD, RICHARD LAUGÉ, ANNE-LAURE PELLIER ET THIERRY LANGIN

IBP, Université Paris-Sud 91405 ORSAY, FRANCE

Colletotrichum lindemuthianum est le champignon responsable de l'antracnose du haricot commun, *Phaseolus vulgaris*. Son cycle infectieux, de type hémibiotrophe, se caractérise (1) par la mise en place coordonnée dans le temps et l'espace de structures d'infection spécifiques, et (2) par la succession d'une phase de biotrophie et d'une phase de nécrotrophie, phase pendant laquelle apparaissent les symptômes macroscopiques d'antracnose. Le criblage d'une collection de mutants non pathogènes générés par mutagenèse insertionnelle a conduit à l'identification du mutant H433, incapable d'effectuer la transition phase biotrophe/phase nécrotrophe. La construction d'un mutant nul par remplacement de gène a permis de démontrer que ce phénotype résultait de l'inactivation du gène *clta1*. *CLTA1* est un facteur de transcription appartenant à une famille d'activateur transcriptionnel spécifique des champignons (Dufresne et al, Plant Cell (2000), 12(9): 1579-1590). Ces activateurs se caractérisent par la présence de 3 domaines fonctionnels : (1) un doigt de Zinc binucléaire à six cystéines (Zn2C6) N-terminal, (2) un domaine MHR (Middle Homology Region), impliqué dans la reconnaissance de la séquence cible, et (3) un domaine d'activation C-terminal riche en acides aminés acides et basiques. La transition biotrophie/nécrotrophie du cycle infectieux met en jeu une transition développementale (hyphes I vers hyphes II) et un changement de mode trophique (biotrophie vers nécrotrophie). Le mutant *clta1-* est incapable d'effectuer la transition biotrophie/nécrotrophie. L'analyse d'un très grand nombre de sites d'infection a permis de montrer que le phénotype non pathogène résultait de l'incapacité du mutant nul (*clta1Dhph*) à différencier des hyphes secondaires. Nous avons montré par RT-PCR que le gène *clta1* était induit in planta 2/3 jours Post-infection. L'hypothèse est donc que *CLTA1* serait impliqué dans la mise en place des hyphes II à partir des hyphes I. L'identification d'un ou de plusieurs gènes cibles de cet activateur devrait permettre de valider cette hypothèse, et de décortiquer le ou les programmes génétiques impliqués. Pour cela, différentes approches génétiques (hybridation soustractive, surexpression de *clta1*), biochimiques et bioinformatique ont été mises en place.

P-13 CONSTRUCTION OF A REFERENCE MICROSATELLITE GENETIC MAP OF *MAGNAPORTHE GRISEA* AND ITS USE FOR MAPPING AVIRULENCE GENES.

CLAUDIA KAYE, AMANDINE BORDAT, YANLI WANG, CHENGYUN LI, TANEE SREEWONGCHAI, SOPHIE ROSENFELD, PATTAMA SIRITHUNYA, YING SHEN, MARC HENRI LEBRUN, DIDIER THARREAU

TA 41/K 343898 MONTPELLIER, FRANCE

In spite of their importance in the resistance durability phenomena, molecular mechanisms for the recognition of fungal pathogens by their host plant remain poorly understood. To date, Twelve fungal avirulence genes have been cloned, including 4 from *Cladosporium fulvum* and 5 from *Magnaporthe grisea*. The peptides encoded by these genes share no structural homology, except for their size which is generally (but not always) small. Thus, studying more avirulence genes is desirable. The genome sequence of *Magnaporthe grisea* was released recently [Magnaporthe Sequencing Project. Ralph Dean, Fungal Genomics Laboratory at North Carolina State University (<http://www.fungalgenomics.ncsu.edu>), and Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research (<http://www-genome.wi.mit.edu>)]. This provides a useful tool to rapidly develop microsatellite molecular markers. Among the 1,436 microsatellite sequences identified in the genome (that were composed of di, tri and tetra nucleotides of at least 18 nucleotides), we chose 341 sequences, distributed throughout the genome, to define primers pairs allowing for their amplification by PCR. Eight percent of these primers did not amplify any product. Among the others, 43 % revealed polymorphism between the parents of a reference cross (Guy11 x 2539) as analysed on 3 % agarose gels. One hundred-thirty four microsatellite markers could be added to the existing reference map. These markers are distributed over the six chromosomes at an average distance of 10 cM. The descendants of four crosses between different *M. grisea* strains were analyzed by pathology testing and 9 avirulence genes were identified. The reference microsatellite map was used to choose markers that allowed us to map them in the new crosses or to increase the density of markers in areas surrounding the avirulence genes. In most cases, when comparing the location of markers in different crosses, the order of markers and distances between markers were conserved. Some evidence for rearrangements were, however, found. The use of a reference microsatellite map turned out to be very rapid and very efficient for the construction of framework genetic maps and rough mapping of a gene. For example, for a new cross for which no information was known, we could construct in just 3 weeks, a framework map using 94 progeny and 52 markers covering the 6 chromosomes. Since the genome sequence is available, increasing the number of markers in one particular area should become relatively easy.

P-14 LA COLLECTION D'AGROTRANSFORMANTS DE *LEPTOSPHAERIA MACULANS* : UNE RESSOURCE POUR LA GÉNOMIQUE

E. REMY, M.H. BALESSENT, M. MEYER, J.P. NARCY, J. ROUX, T. ROUXEL, L. ZHOU ET F. BLAISE

INRA, Route de Saint Cyr 78026 VERSAILLES, FRANCE

Leptosphaeria maculans, agent de la nécrose du collet des crucifères, est un pathogène majeur du colza. C'est un champignon exemplaire des stratégies d'infection des Dothidéomycètes (ou Loculoascomycètes), l'une des classes d'ascomycètes comportant le plus d'espèces de phytopathogènes fongiques aériens. Une collection pilote d'une centaine de transformants obtenue par agrotransformation a récemment été générée et caractérisée, ce qui a permis de démontrer la faisabilité de cette stratégie pour identifier des mutants effectivement étiquetés et affectés dans leur pathogénie. Ici, nous décrivons la génération et l'analyse de 1500 nouveaux transformants. Le pouvoir pathogène de chacun des transformants a été évalué par des tests sur cotylédons de colza en conditions contrôlées. Environ 5 % d'entre eux sont altérés dans leur capacité à infecter leur plante hôte, et se répartissent en quatre classes distinctes en fonction du phénotype de l'interaction : induction d'une HR typique, induction d'une réaction nécrotique non surmontée, induction d'une résistance évoluant vers l'infection et hypo/hyper-agressivité. D'autre part, la coségrégation du marqueur de sélection (majoritairement monogénique) avec le phénotype mutant observé a été déterminée via une analyse génétique pour huit des transformants d'intérêt identifiés pour l'instant. Le taux d'étiquetage effectif est de 37.5 %. La collection de transformants de *Leptosphaeria maculans* sera accrue dans un avenir proche à 5000 individus, et les pieds d'insertion du T-DNA seront systématiquement séquencés, notamment par TAIL-PCR (Thermal Assymetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) afin de générer un répertoire d'étiquettes dispersées aléatoirement sur la séquence du génome. Nous disposerons alors d'une vaste banque, outil original pour un Dothidéomycète et très utile dans la perspective du séquençage prochain du génome de *Leptosphaeria maculans*.

P-15 DÉFINITION DU TRANSCRIPTOME DE *PHYTOPHTHORA PARASITICA* AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU CYCLE INFECTIEUX À TRAVERS LA GÉNÉRATION D'ESTS

FRANCK PANABIÈRES, JO-YANNE LE BERRE, JOËLLE ANSELEM, VIRGINIE COLAS, PAUL VENARD

Centre INRA de Sophia-Antipolis, BP 167 400 route des Chappes 06903 SOPHIA-ANTIPOLIS, FRANCE

Au sein des oomycètes, les microorganismes du genre *Phytophthora* sont responsables collectivement des pertes les plus considérables observées chez les cultures de dicotylédones. La particularité taxonomique de ces microorganismes rend difficile le contrôle chimique et génétique des maladies à *Phytophthora* et nécessite le développement de ressources génomiques spécifiques. Nous cherchons à identifier les déterminants du pouvoir pathogène de *Phytophthora parasitica*, agent pathogène hémibiotrophe, tellurique à large spectre d'hôte, à travers la compréhension de l'état du transcriptome au cours de son cycle biologique, ainsi que lors du déroulement du cycle infectieux. La première étape a consisté à générer plusieurs milliers d'ESTs issues de banques ADNc correspondant au stade de croissance végétative *in vitro*, et à l'invasion de racines d'une plante hôte, la tomate. Le séquençage de 7680 clones a conduit à la génération de 7480 ESTs. Le regroupement des séquences (clustering) a permis l'identification de 3548 gènes de *P. parasitica* et de 677 gènes de tomate. L'annotation fonctionnelle de ces gènes a été effectuée selon la classification hiérarchique du MIPS. Les principaux résultats sont de plusieurs ordres. - Le métabolisme lipidique est particulièrement actif lors de la croissance végétative *in vitro*, et beaucoup moins représenté lors de l'interaction avec la plante hôte, alors que la représentation des autres voies métaboliques reste globalement stable. - Cette régulation du métabolisme lipidique semble coordonnée à celle de la superfamille des gènes codant pour les élicitines, effecteurs de réactions de défense. L'interaction entre élicitines et lipides a été démontrée pour au moins deux membres de cette famille. - De nombreux gènes candidats dont le rôle dans le pouvoir pathogène a été démontré au cours d'interactions plantes-microorganismes sont exprimés *in vitro*, suggérant des fonctions essentielles au développement de *Phytophthora*. - L'interaction avec la plante hôte s'accompagne de profonds changements transcriptionnels, et révèle de nouveaux gènes candidats. La fonction potentielle de ces gènes suggère que le pouvoir pathogène se manifesterait davantage par des mécanismes de reconnaissance étroite avec l'hôte plutôt que par la production d'enzymes de dégradation. Les perspectives sont d'une part, d'effectuer une analyse globale du transcriptome au cours du développement ainsi qu'au cours du cycle infectieux à l'aide d'une puce à ADN en cours d'élaboration, d'autre part à travers la validation des premiers candidats obtenus par analyse fonctionnelle (analyse de l'expression et transformation de *Phytophthora*).

P-16 GENE REGULATION OF SOLOPATHOGENIC STRAIN OF *SPORISORIUM REILIANUM* DURING EARLY STAGE OF INFECTION

SABBAGH, S.K., BADIE, A., SEJALON-DELMAS, N. AND ROUX, C.

UMR CNRS-UPS, 24, chemin de Borde-Rouge, BP 17, 31326 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

Sporisorium reilianum f.sp.*zeae* (Kühn) Langdon and Fullerton (Basidiomycota, Ustilaginaceae) is the causal agent of head smut of maize (*Zea mays* L.). Among the fungal diseases that affect maize crop worldwide, head smut remains one of the most important as no defence genes have been identified so far. *S. reilianum* is considered as a soil fungus as it forms encysted dicaryotic cells, called teliospores. Teliospore viability could rise up to 5 years (Matyac and Kommedahl 1985). As most of Ustilaginaceae, *S. reilianum* exhibits two forms in its life cycle: a unicellular nonpathogenic haploid form and a filamentous pathogenic dicaryotic form. Cell fusion between compatible haploid yeast-like strains results in dikaryotic hypha. The dikaryotic hyphae are pathogenic, penetrate maize root, grow up to the apical meristem, and stay in this tissue as a biotrophic endophyte, inducing few symptoms on the vegetative part (Martinez et al. 1999). After maize floral induction, hyphae become necrotrophic and sporogenetic, forming a black sorus instead of the ear or tassel (Martinez et al. 2002). As mentioned above, pathogenicity is usually dependent of the formation of dicaryotic hypha after mating of two compatible haploid yeasts. It is known that among Ustilaginaceae, meiotic accident can lead to the formation of stable dicaryotic yeastlike strain, whereas dicaryotic stage is generally unstable. It was demonstrated that in absence of the host, dicaryotic yeast degenerate in a haploid form, losing one of the two nuclei (Trueheart and Herskowitz 1992). Stable dicaryotic strains have the specificity to infect maize without fusing with an other strain. For this reason these strains are called solopathogenic. In order to investigate gene regulation during the early steps of infection, we isolated stable solopathogenic strains of *S. reilianum*. Our approach consists in the characterisation of the transcriptome of a solopathogenic strain in response to maize root exudates by using a “suppressive subtractive hybridization” (SSH) approach. Our objective is to characterise the “host controlled pathway” involved in the induction of pathogenicity in Ustilaginaceae as proposed the global regulation schema described in *Ustilago maydis* (Kahmann and Kämper 2004).

P-17 OBTENTION DE QUANTITÉS NON-LIMITANTES D'ADN DU PHYTOPLASME DU STOLBUR PAR AMPLIFICATION ALÉATOIRE DU GÉNOME COMPLET

GÉRALDINE GOURGUES, PASCAL SIRAND-PUGNET, XAVIER FOISSAC, AGNÈS CIMERMAN ET ALAIN BLANCHARD

INRA, IBVM, 71 av. E. Bourlaux 33883 VILLENAVE DORNON, FRANCE

Le phytoplasme du Stolbur est une bactérie de la classe Mollicutes responsable de la maladie du Bois Noir de la vigne. Dans les plantes, cette bactérie est localisée exclusivement dans la sève élaborée (phloème) où elle se multiplie, et est transmise de plante à plante par un insecte polyphage, *Hyalestes obsoletus*. Parmi les 11 génomes de mollicutes actuellement disponibles, un seul provient d'un phytoplasme (*Candidatus Phytoplasma asteri*, Oshima et al., *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):27-9). Le projet mené au laboratoire a pour but de séquencer le génome du phytoplasme du Stolbur afin de réaliser des études de génomique comparative, d'obtenir de nouveaux marqueurs génétiques et d'identifier de potentiels facteurs de virulence. Comme les autres phytoplasmes, le phytoplasme du Stolbur reste, jusqu'à présent, non cultivable et doit être maintenu par greffage dans une plante hôte expérimentale, la pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus*. Cette contrainte rend difficile l'obtention d'ADN génomique de la bactérie, ce qui limite les possibilités d'exploitation génomique. Dans une première étape du projet, le chromosome du phytoplasme (834 kpb) a été séparé de l'ADN de plante par électrophorèse en champs alternés. A l'issue de cette étape, seule une faible quantité d'ADN bactérien, insuffisante à la construction de banques, est obtenue. La seconde phase du projet a consisté à obtenir des quantités non limitantes d'ADN par amplification aléatoire de la totalité du génome à l'aide de la polymérase du bactériophage Phi29 de *Bacillus subtilis* (GenomiPhi® – Amersham bioscience). A partir de l'amplifiât obtenu, une banque contrôle a été construite et vingt clones ont été analysés par séquençage. Seize clones contenaient un insert présentant une forte similarité (blastx) avec des protéines déduites du génome de *Candidatus Phytoplasma asteri*. Un certain degré de redondance a été trouvé entre quelques séquences. Pour trois des quatre clones n'ayant pas montré de similarité significative en analyse blastx, une analyse blastn révèle une similarité avec des séquences provenant également de *Candidatus Phytoplasma asteri*. Cette analyse suggère que l'ADN de phytoplasme du Stolbur représente au moins 95% de l'ADN présent dans l'amplifiât GenomiPhi®. Des analyses complémentaires sont en cours pour évaluer plus précisément la redondance de la banque et le degré de contamination par de l'ADN de la plante hôte.

P-18 CARACTÉRISATION D'UNE SÉQUENCE D'INSERTION (IS) CHEZ LES SOUCHES DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PATHOVAR *PHASEOLI* ET RECHERCHE DE SON IMPLICATION DANS LA RELATION DE PATHOVAR *PHASEOLI*/PHASEOLUS

ALAVI S. M. ET MANCEAU C.

INRA, 42 rue Georges Morel 49071 BEAUCOUZÉ CEDEX, FRANCE

La spécificité d'hôte chez les bactéries phytopathogènes est souvent expliquée par la relation gène-pour-gène qui régit l'interaction au niveau race-cultivar entre les bactéries et les plantes. Au niveau pathovar/espèce comme dans le cas de pathovar *phaseoli* de *X. axonopodis* vis à vis de *Phaseolus* le mécanisme responsable de la spécificité de l'interaction qui abouti à la maladie n'est pas connu. L'étude de la diversité génétique de ce pathovar, par AFLP, a montré que le pathovar *phaseoli* était constitué de plusieurs lignées génétiques au sein de l'espèce *X. axonopodis*. Toutefois, les différentes souches appartenant de ce pathovar partagent toutes une séquence courte de 166pb extraite par hybridation soustractive. Un réactif moléculaire a été développé pour la détection du pathovar *phaseoli* de *X. axonopodis* dans les semences et l'environnement à partir de cette séquence. L'analyse de la séquence génomique de ce fragment indique une homologie avec l'ISpa1328 de *Pseudomonas aeruginosa*, l'ORF171 du plasmide pCARI de *P. resinovorans*, les IS402 et IS1356 de *Bulkholderia cepacia* et également l'IS1090 de *Ralstonia autropa*. Nous avons repéré au moins six insertions de cet élément dans le génome de la souche CFBP4834 de *X. a. pv. phaseoli*. D'autre part, l'analyse de séquences adjacentes de ces insertions a aboutie à la découverte de la séquence complète de cette insertion ainsi que les cibles génomiques de cet élément transposable. Parmi ces sites est trouvé un homologue de *avrBst* de *Xanthomonas vesicatoria* flanqué par deux séquences insertion différentes. La présence ou l'absence de cette séquence d'insertion a été étudiée chez une vingtaine de souches différentes du pathovar *phaseoli*. Les premiers résultats montrent un polymorphisme de l'insertion de cette IS entre les souches de *X. a. pv. phaseoli*. La recherche d'insertion commune à toutes les souches et l'étude du polymorphisme d'insertion de cette IS est en cours d'étude pour préciser son implication dans la spécificité de l'interaction pathovar *phaseoli* /*Phaseolus* et pour préciser l'évolution du génome du *X. a. pv. phaseoli*.

P-19 VARIATION IN VITRO DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DE DÉGRADATION DE PAROIS CELLULAIRES DU BLÉ CHEZ *MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA* EN FONCTION DE LA SOURCE DE CARBONE.

DOUAIHER MN, DUMORTIER V, NOWAK E, REIGNAULT PH ET HALAMA P

Institut Supérieur d'Agriculture de Lille-Université du Littoral Côte d'Opale, 48 Bvd Vauban 59000 LILLE, FRANCE

Deux espèces fongiques sont à l'origine des septorioses du blé : *Phaeosphaeria nodorum* (*Stagonospora nodorum*) et *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*). Depuis quelques années, au sein des espèces responsables de la septoriose, *M.graminicola* apparaît comme l'espèce dominante. La dégradation enzymatique des parois permet la pénétration du parasite, sa progression à l'intérieur des tissus de l'hôte et la libération d'oligosaccharides métabolisables et éliciteurs des réactions de défense de la plante. Si l'étude des enzymes de dégradation de parois cellulaires de blé a déjà été réalisée pour *P.nodorum*, aucune étude n'a été faite pour *M. graminicola*. Notre étude a pour objectif de comparer la production de ces activités chez deux souches de *M. graminicola* (323 et 94269) de mating-types opposés sur trois milieux de culture différant entre eux par leur source de carbone. Les cultures in vitro sont réalisées sur milieu liquide en conditions contrôlées. Les milieux de culture comparés sont constitués du milieu de base synthétique avec trois sources de carbone différentes : 1% (w/v) galactose (milieu S+G), 1% (w/v) parois cellulaires de blé (milieu S+P) ou 1% (w+v) galactose + 1% (w/v) parois cellulaires (milieu S+G+P). Les activités enzymatiques étudiées sont endoglycosidasiques (cellulase, polygalacturonase, β -1,3-glucanase et xylanase) et exoglycosidasiques (B-xylosidase, B-glucosidase, B-galactosidase et a-arabinosidase). Des dosages enzymatiques sont réalisés tous les deux jours ; les cultures étant conduites pendant 20 jours. Des ANOVA ainsi que le test de Tukey ont été réalisés pour différencier les souches sur chacun des milieux testés ; puis une ACP a été réalisée. Notre étude met en évidence d'une part la production des enzymes de dégradation de parois cellulaires du blé par *M.graminicola* in vitro, et d'autre part des différences d'activités enzymatiques en fonction des souches et des sources de carbone utilisées. La cinétique révèle que les activités exoglycosidasiques sont produites plus tardivement. L'activité xylanasique s'est révélée être la plus importante pour les deux souches dans les milieux contenant les parois cellulaires. Dans le milieu S+P, la souche 94269 produit un niveau plus élevé de b-xylosidase comparativement à la souche 323. Généralement, cette activité est produite dans les derniers jours de culture. Les niveaux d'activité de la cellulase varient suivant la source de carbone utilisée : cette activité est la plus élevée en présence de galactose. La b-1,3-glucanase a été la seconde enzyme la plus produite. Les niveaux d'activité glucanasique les plus élevés ont été atteints dans les milieux à base de parois cellulaires de blé. L'activité polygalacturonase a surtout été exprimée dans les premiers jours de culture. L'ACP a montré que les activités enzymatiques se répartissaient en deux groupes distincts. Le premier groupe comporte la xylanase, B-1,3-glucanase, B-xylosidase, B-glucosidase, B-galactosidase et a-arabinosidase. Le second groupe comprend la cellulase et la polygalacturonase. De plus, le milieu qui s'avère être le plus propice pour la production de la plupart des enzymes testées est le milieu S+P+G. Ces résultats permettent d'envisager l'étude du rôle de ces enzymes dans l'expression du pouvoir pathogène de *M.graminicola*.

P-20 INTERACTIONS HÔTE – PATHOGENE ENTRE DEUX CHAMPIGNONS, *AGARICUS BISPORUS* (CHAMPIGNON DE COUCHE) ET *VERTICILLIUM FUNGICOLA*

M. L. LARGETEAU¹, M. SARTHOU¹, C. REGNAULT-ROGER² ET J.-M. SAVOIE¹,

1 INRA, BP81, 71 Av Edouard Bourleaux 33883 VILLENAVE D'ORNON.

2 UNIV. PAU ET PAYS ADOUR, 64012 PAU UNIVERSITÉ CEDEX.

La môle sèche (dry bubble disease) est une maladie du champignon de couche (*Agaricus bisporus*) répandue dans le monde entier. La France étant le 2ème producteur européen et le 4ème mondial, cette pathologie a un impact économique important. Les pertes en cultures atteignent généralement 8 à 10%, mais une forte attaque peut détruire une production. L'agent causal est un ascomycète, *Verticillium fungicola*, de stade téléomorphe inconnu. L'infection à différents stades de développement du champignon se traduit par plusieurs symptômes. Une infection précoce bloque la morphogénèse et entraîne la formation d'une boule de tissus indifférenciés, la môle. Une infection plus tardive conduit au symptôme du pied éclaté. Des taches peuvent apparaître sur les chapeaux des sporophores. De nombreux travaux sur l'effet des fongicides sont rapportés dans la littérature, et signalent des phénomènes de résistance un peu partout dans le monde. De plus, les fongicides autorisés sont très peu nombreux et la nouvelle législation en restreint l'utilisation dès fin 2004. Le développement de méthodes alternatives de lutte implique de connaître les interactions hôte – pathogène. Le stade de développement auquel *A. bisporus* est colonisé par *V. fungicola* demeurerait inconnu. Notre but est de l'identifier, de caractériser la mole (degré d'infection, viabilité d'*A. bisporus*) et d'effectuer une approche gènes candidats de l'infection en se basant sur la littérature et sur des données biochimiques obtenues au laboratoire. La détection des deux champignons par PCR multiplex a montré la présence de *V. fungicola* au tout premier stade de différenciation du corps fructifère. Des proportions très variables de pathogène ont été trouvées dans les tissus de môles et de pieds attaqués récoltés au hasard dans des cultures contaminées. La progression de *V. fungicola* s'accompagne d'un brunissement puis d'une nécrose des tissus, mais le blocage de la morphogénèse peut se faire sans apparition de brunissement. Le processus d'infection apparaît complexe, lié à la fois à la proportion de pathogène et au niveau de pénétration dans les hyphes de l'hôte. Le pathogène n'a pas été détecté dans les tissus de sporophores sains développés contre des môles. L'approche gène candidats a montré que l'infection n'entraînait aucune modification du niveau de transcription des gènes des hydrophobines HypA et HypB. Les tyrosinases inductibles (ppo2) ne sont pas impliquées lors du déclenchement du processus infectieux. Cependant, le niveau de transcription de ppo2 dans les môles et les pieds attaqués reflète la progression du pathogène dans les tissus de l'hôte. Cette progression s'accompagne généralement d'un brunissement des tissus. L'ensemble des données est discuté en liaison avec les variations isoenzymatiques observées lors de l'infection.

Session C

Réponses
des plantes aux stress biotiques

P-21 CLONAGE POSITIONNEL DE *PI33*, GÈNE DE RÉSISTANCE DU RIZ CORRESPONDANT AU GÈNE D'AVIRULENCE ACE1 DE *MAGNAPORTHE GRISEA*

E. BALLINI, A. BORDAT, E. VERGNE, J.B. MOREL, M.H. LEBRUN, J.L. NOTTEGHEM , D. THARREAU

CIRAD-INRA, TA 41/K 343898 MONTPELLIER, FRANCE

Le pathosystème riz-*Magnaporthe grisea* est utilisé comme modèle des interactions céréale-champignon phytopathogène mais c'est aussi un pathosystème d'importance économique mondiale. Dans ce pathosystème des interactions gène-pour-gène ont été décrites. Le nombre d'interactions spécifiques caractérisées au niveau moléculaire est encore restreint. Après avoir cloné le gène d'avirulence Ace1 de *Magnaporthe grisea* (Böhnert et al 2004, Plant Cell), nous avons entrepris le clonage positionnel du gène de résistance correspondant Pi33. Pi33 a été localisé sur le chromosome 8 du riz dans deux croisements indépendants (Berruyer et al 2003, TAG). Une cartographie fine a permis de placer le gène entre deux marqueurs distants de 230 kb. Dans cette zone, un cluster de 8 gènes candidats a été mise en évidence par analyse de la séquence du génome d'une variété de riz dépourvue de Pi33. La définition de nouveaux marqueurs est en cours pour essayer de restreindre le nombre de candidats potentiels. L'étude du cluster a été initiée. Le séquençage des différents gènes candidats chez différentes variétés avec ou sans Pi33 est en cours. Leur expression est également étudiée.

P-22 UN NOUVEL ÉLICITEUR FEN560 POTENTIALISE LES MÉCANISMES DE DÉFENSE CHEZ PLUSIEURS MODÈLES PLANTES/ AGENTS PATHOGÈNES

CHRISTELLE SIDDI*, ISABELLE LESTIENNE**, FANNY MEYTRAUD*, PHILIPPE MARMEY**, JEAN-CLAUDE BACCOU*, MICHEL NICOLE**, ET CHRISTELLE MARTINEZ***.

IRD, 23, place eugène bataillon 34095 MONTPELLIER, FRANCE

La société SOFT, en collaboration avec l'Université des Sciences de Montpellier, a mis au point FEN560, un nouvel éliciteur issu de graines de légumineuses qui répond aux préoccupations environnementales actuelles. Les objectifs de notre étude sont de déterminer l'efficacité ainsi que le mode d'action de FE56 sur trois pathosystèmes : melon/*Sphaerotheca fuliginea* (Oi), melon/*Fusarium oxysporum sp. melonis* (Fu), et cotonnier/*Xanthomonas campestris pv. malvacearum* (Xcm). Ils ont été choisis pour la diversité de leurs agents pathogènes : un champignon foliaire (Oi), un champignon racinaire (Fu), et une bactérie (Xcm). Nos résultats montrent que la pulvérisation de FEN560 protège les plantes contre l'apparition des symptômes de la maladie pendant un mois environ. Le traitement par pulvérisation de l'éliciteur induit le phénomène de priming chez les plants de melon et de cotonnier, après infection par l'agent pathogène. En effet, on observe une induction plus rapide et plus intense des mécanismes de défense (activité peroxydase et production d'acide salicylique) après infection par l'agent pathogène des plants prétraités par FEN560. De plus, nos résultats suggèrent l'existence de deux voies de signalisation menant à l'induction de ces mécanismes, ces deux voies étant différentes d'une variété de melon à l'autre. Pour finir, nous avons testé l'effet de deux traitements successifs de FEN560 à 24h d'intervalle. Ces deux pulvérisations consécutives entraînent la potentialisation de la production d'acide salicylique. Nos résultats suggèrent que le site de cette potentialisation dépend de la localisation du second traitement (infection par l'agent pathogène ou pulvérisation par FEN560).

P-23 RELATIONSHIPS BETWEEN CALCIUM, NITRIC OXIDE AND ACTIVE OXYGEN SPECIES IN GRAPEVINE DEFENSE RESPONSES

VANDELLE E., POINSSOT B., WENDEHENNE D., BENTÉJAC M. AND PUGIN A.

INRA-Université de Bourgogne, 17 rue Sully BP 86510 21065 DIJON, FRANCE

We recently reported the identification of an endopolygalacturonase (BcPG1) from *Botrytis cinerea* culture filtrate as a potent elicitor of defence responses in grapevine, independently of its enzyme activity [1]. We further analyzed the signalling pathways triggered by BcPG1 in grapevine cells. Our data indicated that BcPG1 induces a Ca²⁺ entry, which leads to elevations of free cytosolic calcium concentration, active oxygen species production and a phosphorylation-dependent nitric oxide (NO) production via an enzyme pharmacologically-related to a nitric oxide synthase (NOS). We provided evidence that in this process, NO is involved i) in the activation of Ca²⁺-permeable channels localized on intracellular store membranes, ii) in the repression of plasma membrane Ca²⁺-permeable channel activity or alternatively in the activation of Ca²⁺-ATPase, iii) in the activation of active oxygen species (AOS) production and iv) in defence gene expression, including phenylalanine ammonia lyase (PAL1) and stilbene synthase (VST1), which encoded enzymes responsible for phytoalexin biosynthesis. In this pathway, our data showed that BcPG1 induces a signalling cascade including Ca²⁺ influx, NO and AOS production in this order. Moreover, NO regulates Ca²⁺ fluxes across plasma membrane and defense gene expression. Interestingly, mitogen-activated protein kinases (MAPK) activation is independent of these events [2].

[1] Poinssot B., Vandelle E., Bentéjac M., Adrian M., Levis C., Brygoo Y., Garin J., Sicilia F., Coutos-Thévenot P. and Pugin A. (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16(6):553-64.

[2] Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D., Bentéjac M. and Pugin A. Relationships between calcium, nitric oxide and active oxygen species in grapevine defense responses. submitted.

P-24 DEFENCE REACTIONS IN GRAPEVINE STOMATA

MATHILDE ALLÈGRE, MARIE-CLAIRE HÉLOIR, MARIELLE ADRIAN, XAVIER DAIRE AND ALAIN PUGIN.

17 rue Sully BP 86510 21065 DIJON, FRANCE

Plasmopara viticola, the causal agent of downy mildew, uses stomata to infect grapevine leaves (*Vitis vinifera* L.). Preliminary data let us to assume that guard cells could be specialized cells in defence against pathogens. Indeed, typical defence responses were shown to be mainly localized in guard cells and elicitors have been reported to modulate stomatal aperture. In order to check this hypothesis, "epidermal peels" were prepared from grapevine leaves. Then, abscisic acid (which action on stomata is very well described in the literature) and the second messengers involved, Ca²⁺ and H₂O₂ were shown to induce the closure of stomata, demonstrating the reliability of this system. We describe here the effects of chitosan (obtained from chitin crab shells). This elicitor inhibits the aperture of stomata and induced the production of H₂O₂ in guard cells, detected using the specific probe 2,7 dichlorofluorescein diacetate (2,7 DCFH-DA). Assays are in progress in order to monitor nitric oxide (NO) production using the NO specific probe diaminofluorescein diacetate (DAF2-DA). We plane to verify whether the closure of stomata and strong defence reactions in guard cells reduce the infection by *Plasmopara viticola*.

P-25 ROLE OF PLANT OXYLIPINS IN DEFENCE AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI AND OOMYCETES

PROST I., DHONDT S., CARBONNE F., HAMBERG M., ESQUERRÉ-TUGAYÉ M.T. AND FOURNIER J.

UMR5546 CNRS-UPS Interactions Plantes micro-organismes 24 chemin de Borde Rouge BP 17, Auzeville 3132 Castanet-Tolosan France

Plants are constantly challenged by various pathogens. Among them, fungi and oomycetes are a major group of highly damaging, eukaryotic parasites. To protect themselves, plants have developed constitutive and inducible mechanisms. Recent studies focusing on inducible plant defence responses have highlighted the role of small molecules generated through the lipoxygenase pathway, called oxylipins. Some oxylipins display antimicrobial activity against fungi but only few compounds and pathogens have been tested so far. We investigated the *in vitro* antimicrobial activity of 43 purified oxylipins against several fungi and oomycetes. Mycelium growth inhibition was assessed after oxylipin treatment at 100 μ M. Bioassay results indicate that 6 compounds display high toxicity towards tested pathogens. Despite their low stability in liquid medium, these 6 compounds were able to inhibit both spore germination and mycelium growth by more than 50%. Concentration required to inhibit growth by 50% ranged from 23 to 130 μ M. Protection assays on *Arabidopsis thaliana* infected with *Botrytis cinerea* or *Colletotrichum destructivum* are performed to confirm the antimicrobial effect of these compounds. Oxylipin synthesis through 9-lipoxygenases and the 9-LOX pathway is involved in the defence mechanisms of solanaceous plants against microbial pathogens. We are currently investigating the role of this pathway in *Arabidopsis thaliana*. At Col-0 plants over-expressing an endogenous 9-LOX gene (AtLOX1) have been selected on the basis of RNA and protein levels. Oxylipin profiles and resistance to fungi are being assessed in these transgenic lines.

P-26 PHYLOGENETIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *WRKY* GENE FAMILY IN RICE.

S. BERRI, A. BILY, O. FAIVRE-RAMPANT, E. GUIDERDONI AND P. PIFFANELLI

CIRAD, Avenue Agropolis 34398 MONTPELLIER, FRANCE

The analysis of the full genome sequence of rice highlights the presence of 107 genes encoding for transcription factors of the *WRKY* family. Those proteins have one or two ~70 aa consensus sequence characterized by a very highly conserved WRKYGQK motif together with a zinc-finger-like motif C-X4-7-C23-28-H-X1-2-(H/C) that provides binding properties to DNA. Proteins containing two *WRKY* motifs usually have an N-terminal consensus sequence that is shorter and/or incomplete and does not appear to have a main role in DNA binding. Comparative phylogenetic analysis of this family in rice as well as in other organisms where *WRKY* genes were identified reveals that their ancient origin predates the divergence of plants and points out their later tremendous duplication in land plants and in particular in monocotyledonous and dicotyledonous plants. With the purpose of understanding a possible reason for this huge amplification, we are focussing on determining their function in rice, mainly following with 2 approaches: 1) analysis of insertion mutants; and 2) characterization of *WRKY* gene expression profile. Several groups developed insertion populations for rice, and we have been able to search for insertion in different members of this important gene family. Our screening led us to identify several rice-mutated lines containing an insertion in the coding and/or in regulatory region of *WRKY* genes. We have focussed our attention toward 20 of such lines and we are currently analyzing their phenotypic response to four host and non-host strains of the main important rice pathogen *Magnaporthe grisea*. As for the second approach, we are currently performing a characterization of the expression profile of all the members of the family, analyzing several plant organs and different growth condition . A preliminary analysis of 28 *WRKY* genes allowed us to identify *OsWRKY76* as induced by salicylic acid treatment, a signalling hormone often involved in response to stresses. For this gene an RNAi construct has been prepared and will be soon used to transform rice plants. At the moment an analysis of the whole gene family is going to be carried out using the oligo-microarray techniques.

P-27 ETUDE DU TRANSCRIPTOME DU MUTANT *HXC2* : ANALYSE FONCTIONNELLE DE GÈNES CANDIDATS

NOELLIE JOURNOT CATALINO, THOMAS KROJ ET DOMINIQUE ROBY

LIPM, UMR CNRS/INRA 2594/441, BP52627, 31326 CASTANET TOLOSAN, FRANCE

Le mutant *hxc2* (hypersensitivity to *Xanthomonas campestris*) est un mutant d'*Arabidopsis thaliana* initialement identifié sur la base d'une altération de la résistance à la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), souche avirulente 147. Par la suite, *hxc2* s'est aussi révélé plus sensible à la bactérie phytopathogène virulente *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), souche *DC3000*. Ces résultats, enrichis par des analyses d'expression de gènes marqueurs de la mise en place des défenses, permettent de penser qu'*hxc2* est un nouvel élément de type eds (enhanced disease susceptibility), impliqué à la fois dans les mécanismes de résistance spécifique à *Xcc147* et dans les mécanismes de résistance basale permettant de limiter la croissance de bactéries virulentes telles *Pst DC3000*. Afin de mieux comprendre le rôle et la place de *HXC2* dans ces voies de résistance, une analyse du transcriptome du mutant, comparativement au type sauvage au cours de l'interaction incompatible avec *Xcc147*, a été réalisée. Les premiers résultats mettent en évidence des changements importants dans les activités transcriptionnelles : sur 8500 gènes analysés (soit un tiers du génome d'*Arabidopsis*), l'expression de 7% d'entre eux (583 gènes) est modifiée chez le mutant comparé au sauvage. Ces gènes appartiennent à différentes familles fonctionnelles, et l'intérêt a été plus particulièrement porté sur ceux relatifs à la transduction du signal (4%) et à la régulation de la transcription (5,6%). Après validation des données par analyse de l'expression de 20 gènes candidats par PCR quantitative, quatre gènes candidats ont été retenus et l'analyse fonctionnelle de ces gènes a été entreprise. Actuellement, notre intérêt se porte plus particulièrement sur un facteur de transcription appartenant à la grande famille des *WRKY*, *WRKYA*, qui semblerait impliqué dans la mise en place de la résistance basale. En effet, un mutant présentant une surexpression d'une forme tronquée de ce facteur de transcription a une résistance accrue à des souches avirulentes et virulentes de *PstDC3000*. En parallèle, il nous a semblé essentiel d'analyser les éventuels problèmes de redondance fonctionnelle, problèmes fréquemment rencontrés, chez les plantes, au sein des grandes familles de facteurs de transcription. Afin d'évaluer celle-ci, l'étude de l'expression, au cours d'une infection, des 6 autres membres de la sous famille à laquelle appartient *WRKYA*, a été entreprise. Les premières analyses permettent de penser qu'un autre membre de cette famille, *WRKYB*, participe lui aussi à la mise en place des mécanismes de résistance et est co-régulé avec *WRKYA*. L'analyse fonctionnelle de *WRKYB*, nouvel élément potentiel des voies de résistance, a donc été entreprise. Des résultats concernant l'analyse du phénotype de ces mutants seront présentés et discutés dans le contexte de la mise en place, chez les plantes, des mécanismes de la résistance basale et de leur participation à l'établissement de la résistance spécifique.

P-28 PLACEMENT OF TWO MUTATIONS, *VAD1* AND *HLM1* IN SIGNALLING PATHWAYS LEADING TO THE HYPERSENSITIVE CELL DEATH IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

OLIVIER BOUCHEZ, SÉVERINE LORRAIN, MARIE-CHRISTINE AURIAC, DOMINIQUE ROBY ET CLAUDINE BALAGUÉ

LIPM, UMR CNRS/INRA 2594/441, BP52627, 31326 CASTANET TOLOSAN, FRANCE

Hypersensitive Response (HR) characterized by a programmed, rapid and localized cell death at the inoculation site. To identify and characterize genes involved in the regulation of HR-related cell death programmes, one powerful approach is to look for mutants showing spontaneous "HR-like" lesions in the absence of any pathogen (lesion mimic mutants). By screening a T-DNA mutagenized seed library of *Arabidopsis*, we identified novel mutations, causing aberrant regulation of cell death, manifested by a lesion mimic phenotype and an altered HR. Two of them will be more particularly described : *vad1* (for vessel associated cell death) which displays necrotic HR-like lesions, propagating along the vascular system and whose appearance is light conditional; *hlm1* (for HR-like lesion mimic) which shows discrete In plants, one of the most efficient resistance reaction to pathogen attack, is the so-called necrotic lesions randomly dispersed on the leaves, and which is impaired in its HR to different bacterial pathogens. Both mutations segregate as single recessive alleles. Lesion formation was associated with expression of defense genes, production of high levels of salicylic acid (SA) and increased resistance to virulent and avirulent strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *VAD1* encodes a novel putative membrane associated protein containing a GRAM domain (a lipid- or protein-binding signaling domain), *HLM1* encoding a cyclic nucleotide gated channel, CNGC4. In terms of expression patterns, both genes present very different profiles, in relation with the phenotypes conferred by the corresponding mutations (*vad1* : propagation mutant; *hlm1*, initiation mutant). *VAD1* and *HLM1* might thus constitute new potential components of the signaling pathways leading to HR/resistance, in the vicinity of vascular bundles in the case of *VAD1*. In order to get a better insight into their functions in cell death/resistance pathways, analysis of the progeny from crosses between *vad1* plants and either *nahG* transgenic plants, *sid1*, *sid2*, *npr1*, *eds1* or *ndr1* mutants, revealed the *vad1* cell death phenotype to be dependent on SA biosynthesis, but *NPR1*-independent; in addition, both *EDS1* and *NDRI* are necessary for the proper timing and amplification of cell death, as well as for increased resistance to *Pseudomonas* strains. Similarly, the *hlm1* cell death phenotype is dependent on SA, as shown by crosses with *nahG* and *sid2*. Taken together, these results suggest that these genes might belong to the "SA autoregulatory loop".

P-29 ARGEBIOS: INTEGRATED ANALYSIS OF T-DNA MUTANT COLLECTIONS FOR RESISTANCE TO BIOTIC STRESS IN RICE

CAROLINA GONZALEZ, O. FAIVRE-RAMPANT, J-B MOREL, C. GONZALEZ, V. VERDIER, L. ALBAR, C. BRUGIDOU, G. DROC, E. GUIDERDONI AND P. PIFFANELLI

CIRAD, 52 avenue de Villeneuve 66860 PERPIGNAN, FRANCE

We created a network, called ARGEBIOS (Agropolis Reverse GENetics for BIOTic Stress), of four laboratories involved in the area of resistance to biotic stress resistance in rice to collectively analyse compromised phenotypes of T-DNA tagged lines identified by reverse genetics approach. The ARGEBIOS integrated approach aims at identifying novel signalling and effector components involved in broad-spectrum resistance to biotic stress in rice and in specific pathways leading to resistance to bacterial, fungal and viral pathogens. Candidate genes were identified from transcriptome and proteome data generated in the four laboratories and from available data in the literature. Mutant T2 rice lines in candidate genes are analysed for compromised resistance to host and non-host rice pathogens and genotyped to verify the linkage between the identified phenotype and the T-DNA insertion. So far 150 mutant lines were analysed for compromised resistance to the three rice pathogens and non-host resistance to *M. grisea* and mutant phenotypes were identified in up to 20% of T-DNA screened lines. C. Brugidou's team is studying the molecular interactions between rice and rice yellow mottle virus (RYMV) to elucidate the mechanisms controlling sensitivity, tolerance and the resistance of rice to the virus. Using a combined transcriptome, proteome and bioinformatic approach, they identified deregulation of host genome expression at the beginning of viral infection process. 550 genes were identified as highly deregulated in Indica and Japonica cultivars and are involved in all functional categories. They are using the ARGEBIOS set-up to functionally validate their implication in the viral infection processes. JB Morel's team is focusing on defining the signalling components involved in durable host resistance to *M. grisea* strains in both Japonica and Indica subspecies. The screen of T2 lines is based upon a compatible interaction enabling to reveal both EDS (enhanced disease susceptibility) and EDR (enhanced disease resistance) type of mutants. P. Piffanelli's team interest lies on the mechanisms leading to cross-species non-host resistance to *M. grisea* strains in rice. A high-throughput inoculation protocol and phenotypic analysis for compromised non-host resistance of rice Nipponbare to *M. grisea* strains attacking other monocots (e.g. wheat, Digitaria, barley) was set-up at CIRAD to identify signalling components involved in type I and type II cross-species resistance mechanisms. V. Verdier's team focuses on the molecular mechanisms leading to resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Screening assays were performed on 30 day-old rice plants by leaf clip inoculation. Symptoms were scored by measuring lesion lengths. Most of the strains induced a susceptible reaction while strain PXO339 induced a moderate resistant reaction (MR) and was selected to screen the T-DNA mutants looking at EDS-type phenotypes. Mutant phenotypes were identified in 13% of T-DNA lines. We are now undergoing high-throughput genotyping of the identified lines following a protocol combining Southern blot and PCR analyses to confirm the linkage between T-DNA and observed phenotypes. The comparative study with fungal, bacterial and viral pathogens will enable to pinpoint shared signalling pathways likely to be potential targets to engineer durable field resistance to rice pathogens.

P-30 IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKER FOR RESISTANCE TO *PHOMA MACDONALDII* USING INDUCED MUTANT LINES OF SUNFLOWER

REZA DARVISHZADEH , JEAN KALLERHOFF AND AHMAD SARRAFI

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (INP-ENSAT-BAP), 18 chemin de Borde Rouge 31326 TOULOUSE, FRANCE

Black stem caused by *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) is one of the most important disease of sunflower. It has been reported from many countries and recognised as one of the most serious disease of sunflower in France. The reduction in the yield and oil content of seed are reported to be around 10-30% to 60% in severe case. Sunflower cultivars show variability in susceptibilities, but no complete resistance to the disease has been reported. The objective of this study was to identify putative molecular markers associated with black stem resistance in sunflower. Mutant lines were developed by irradiation of AS 613 line, productive but sensible to *Phoma*, with gamma ray. The M2 to M6 generation were advanced by single seed descent (SSD). A population of 120 mutant lines, M6, and their parental line AS613 were chosen for this study. The response of this lines were evaluated to an aggressive French isolate at the controlled condition. The experiment was performed in a randomised complete block design with three replication. Each treatment consisted of 12 seedlings. 14-day-old seedling were inoculated with a suspension of pycniospores (10^6 spores/ml). The 3, 5, 7 days later the two cotyledon petioles of each seedling were scored on a 1-9 scale for the percentage of necrotic area and the 3 parameter of disease i.e. disease severity indices (DSI), speed of development of disease (SDD) and the area under the disease progress curve(AUDPC) were calculated for all lines separately. High genetic variability was observed among the mutant lines for resistance to black stem. When 10% of the selected mutants were compared with the AS613, genetic gain was significant for partial resistance to the disease. DNA polymorphisms were revealed by AFLP. 20 AFLP primer pairs combinations were utilised. By studying the association between molecular markers and phenotypic characters three, six and two AFLP markers were detected for DSI, AUDPC and SDD, respectively. Three markers out of six are common for SDI and AUDPC.

P-31 IMPACT OF MODIFICATIONS IN THE LIGNIN METABOLIC PATHWAY ON PATHOGEN RESISTANCE, ANALYZED USING *ARABIDOPSIS THALIANA* MUTANTS: THE INTERACTION OF LIGNIN MUTANTS WITH *PERONOSPORA PARASITICA*.

ANTHONY PEGARD, AYMERICK EUDES, CAO TRUNG DO, LISE JOUANIN, AND HARALD KELLER

INRA, 400 route des Chappes, BP167 06903 SOPHIA ANTIPOLIS, FRANCE

Phenylpropanoid products or derivatives have been proposed to play a major role in plant defense against pests and pathogens. Lignification constitutes a protective barrier, which may hinder or slow the pathogen spread from the infection site. Many programs are underway to modify lignin content and/or structure in order to improve plants for use in paper pulp making or in animal feeding. However, the deregulation of the lignin biosynthetic pathway may have consequences on soluble phenolics since their biosynthesis results from branched and interconnected pathways. Until now, very few studies have focused on the potential impact of these modifications on pathogen resistance. It is therefore primordial to determine if these modifications, beneficial for agro-industrial uses of plants, would not have detrimental consequences on their pathogen resistance. Here, we evaluate in how far the knock-out of single genes, which code for key enzymes of lignin biosynthesis, influences the interaction of *A. thaliana* with the biotrophic oomycete pathogen, *Peronospora parasitica*. The analyses were performed on leaves from *A. thaliana* mutants at different developmental stages, concerned the ability of the oomycete to grow intercellularly, to form haustoria, and eventually, to sporulate. This study will be extended to other lignin mutants, and similar analyses are presently performed with bacterial and fungal pathogens.

P-32 TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF THE PHLOEM IN THE PLANT RESPONSE TO VIRUS, BACTERIA OR FUNGI PATHOGENS.

MORGANE GUILLEROUX, SANDRA THIBIVILLIERS, RACHID AAZIZ, FANCHON DIVOL, FRANÇOISE VILAINE, JOËLLE AMSELEM, CHANTAL KUSIAK AND SYLVIE DINANT.

INRA, Route de St-Cyr 78026 VERSAILLES, FRANCE

Plant/pathogen interactions induce locally a response that can evolve into a systemic infection [1], thereby recruiting the phloem inter-organ communication pathway. Besides transport of pathogens, the main functions of phloem are the transport of photoassimilates from source to sink organs, in addition to long distance signalling and homeostasis [2]. However, little information exists about molecular processes involved during the systemic phloem response to infection, particularly about loading, unloading and trafficking of pathogens in the phloem. The production, amplification and cascade transduction of stress signals during compatible interactions are not well understood. To determine whether the phloem participates in the setting up of such a response, we used a genomic approach using *Apium graveolens* as a model species for direct separation of the phloem from other surrounding tissues [3], challenged with various pathogens. They include the virus Cucumber mosaic cucumovirus, the bacteria *Pseudomonas syringae vs apii* and the fungus *Sclerotinia sclerotinium*. In such a system, the phloem transcriptome was analysed to seek out genes deregulated by pathogen stress. Two subtractive SSH cDNA libraries were constructed from up- and down-regulated mRNAs extracted from the phloem of plants infected by CMV. Combining EST analysis and the production of cDNA macroarray, we examined the expression profile of the genes that were tagged. The expression patterns were compared in the phloem of healthy and infected plants challenged by virus, bacteria and fungus, demonstrating a significant transcriptional response. Furthermore, these data were validated by clustering, before additional confirmations by northern blot or RT-PCR analysis. This enabled the identification of several genes deregulated by pathogens infection. Clustering analysis showed induction of stress related genes as catalase, metallothionein or HSP70 (Heat Shock Protein) as well as genes that are not yet described as induced by virus infection. The analysis of the response to different pathogens showed major transcriptional changes depending of the pathogen, thereby demonstrating various specificities in the transcription responses. Several genes were shown to be up or down-deregulated only in vascular tissues. Further experiments designed to transfer such results to ortholog genes in *Arabidopsis thaliana* were designed and will be presented.

[1] Maule A. et al. 2002. Current Opinion in Plant Biology, 5: 1-6.

[2] Van Bel A.J.E, 2003. Plant, Cell and environment, 26: 125-149.

[3] Vilaine et al. 2003. Plant Journal, 36: 67- 81.

P-33 ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DE LA RÉSISTANCE DU RIZ À *MAGNAPORTHE GRISEA*

EMILIE VERGNE¹, JEAN-BENOIT MOREL¹, DIDIER THARREAU¹, MARC-HENRI LEBRUN², JEAN-LOUP NOTTÉGHÉ¹

1 CIRAD, TA 41/K Campus international de Baillarguet 34398 MONTPELLIER CEDEX, France

2 Bayer Crop Science-CNRS, 14-20 rue Pierre Baizet, 69009 LYON, FRANCE

Dans cette étude, les réponses transcriptionnelles des céréales à l'infection est analysée. En effet, relativement peu de données existent quant à ces réponses et en notamment sur les similitudes et différences pouvant exister entre Monocotylédones et Dicotylédones. La diversité des réactions de défense au sein des Monocotylédones (riz, blé et maïs) et à l'intérieur du genre *Oryza* est aussi au centre de nombreuses questions concernant le niveau de diversité existant, l'origine de cette diversité (séquences codantes ou séquences régulatrices) et les possibilité de transfert d'information d'une espèce à l'autre. Le couple gène-pour-gène utilisé pour cette étude est constitué du gène de résistance de riz Pi33 et du gène d'avirulence de *M. grisea* ACE1. Plusieurs mesures d'expression à l'échelle du transcriptome ont été effectuées à l'aide de puces Agilent. Ces puces possèdent plus de 7000 gènes de riz et l'ensemble des 14000 gènes prédits de *M. grisea*. Les résultats concernant le riz seront présentés. Dans une analyse pilote, 23 gènes validés (sur 38 testés) présentant une expression différentielle au cours de l'infection ont été étudiés. Leur profil d'expression a été étudié dans différentes situations : présence ou absence de Pi33 et/ou niveau de résistance partielle faible ou élevé. Les niveaux d'expression avant infection des gènes analysés semblent varier avec les niveaux de résistance partielle connus. Cette observation suggère qu'une composante de la résistance partielle du riz pourrait être de nature constitutive. Il semble qu'au sein du genre *Oryza*, plusieurs modes d'expression des réactions de défense existent lors de la résistance. Ces modes sont liés à l'espèce d'une part (*O. sativa* et *O. nivarra*) et aux sous-espèces (*O. sativa* de type *indica* et *O. sativa* de type *japonica*). Les modalités de régulation des gènes étudiés semblent donc considérablement varier selon les fonds génétiques dans lesquels ces mesures sont faites. Certains gènes ont fait l'objet d'analyse approfondie concernant un éventuel polymorphisme des séquences codantes et régulatrices. Cette analyse révèle que le polymorphisme de séquence est faible dans les régions codantes des gènes de défense étudiés et qu'il est élevé dans les régions promotrices. L'ensemble des outils d'analyse fonctionnelle chez le riz (Genome Browser notamment, développé au CIRAD par l'équipe d'Emmanuel Guiderdoni) sera présenté comme démonstration de la faisabilité d'approches génomiques de grande ampleur dans cette espèce. Notamment les pathosystèmes blé/*M. grisea* et maïs/*M. grisea* seront présentés.

Ce travail a été financé par le programme Génoplante II OsCrR1 La thèse d'E. Vergne est financée par la région Languedoc-Rousillon et l'INRA-SPE

P-34 ETUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION D'UNE FERRITINE D'ARABIDOPSIS EN CONDITION D'INFECTION PAR LA BACTÉRIE PATHOGÈNE *ERWINIA CHRYSANTHEMI*

Diego SEGOND, Alia DELLAGI, Martine RIGAULT, Frédéric GAYMARD*, Camille ROUX et Dominique EXPERT

Laboratoire des Interactions Plantes Pathogènes UMR 217 INRA, INA-PG, Université Paris 6, 16 Rue Claude Bernard, 75231 Paris cedex 05.

**Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5004, Agro-M/Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Recherche Agronomique/Université Montpellier 2, 34060 Montpellier, Cedex 1, France*

Les dégâts provoqués sur plusieurs cultures maraîchères et ornementales par les pourritures molles sont dus, entre autres, à la bactérie *Erwinia chrysanthemi*. Cette entérobactérie est aussi capable d'infecter *Arabidopsis thaliana*. Les facteurs intervenant dans le pouvoir pathogène de la bactérie sont essentiellement ses pectinases qui dégradent les parois des cellules végétales. *E. chrysanthemi* possède également des systèmes d'assimilation du fer impliquant deux sidérophores et des systèmes de protection contre le stress oxydant qui sont importants pour la survie de la bactérie au cours de l'infection. Par ailleurs, les composants de l'enveloppe bactérienne LPS et EPS sont des facteurs du pouvoir pathogène importants. Le modèle *A. thaliana* / *E. chrysanthemi* est utilisé au laboratoire afin de déterminer la nature moléculaire des réponses de la plante à une infection. A la suite d'un criblage différentiel, nous avons mis en évidence un transcrite codant une ferritine (*Atfer1*) qui est induit chez *A. thaliana* en réponse à une infection par la souche 3937 de *E. chrysanthemi*. Les ferritines sont des protéines ubiquitaires de stockage du fer. Elles sont organisées sous forme de sphères de 24 sous-unités qui peuvent stocker jusqu'à 4500 atomes de fer. Chez les plantes, ces protéines sont localisées dans les plastes et les mitochondries. Chez les animaux, elles sont cytosoliques. Le contrôle de leur expression chez les plantes est essentiellement transcriptionnel. En revanche un contrôle post-transcriptionnel est essentiel à la régulation des ferritines animales. L'expression des ferritines animales ou végétales est fortement induite par un apport de fer. Le génome d'*Arabidopsis* comporte 4 gènes de ferritines *Atfer1,2,3* et *4*. Nous avons étudié l'expression du gène *Atfer1* par RT-PCR, northern blots et fusion GUS. Nos résultats indiquent que l'infection par *E. chrysanthemi* donne lieu une régulation fine de l'expression de *Atfer1* via des éliciteurs bactériens : sidérophores et LPS et par la molécule signal NO. Par ailleurs, un mutant T-DNA n'exprimant plus *Atfer1* devient plus sensible à l'infection par *E. chrysanthemi* indiquant un rôle important de cette protéine dans la résistance de base de *A. thaliana*.

Mots clef : Erwinia chrysanthemi, ferritin, Arabidopsis, LPS, siderophore, fer, NO

P-35 SUPPRESSION OF PATHOGEN-INDUCIBLE PR-1A PROTEIN IN TOBACCO

MARIE-PIERRE RIVIÈRE, ANTOINE MARAIS, ERIC GALIANA

INRA, 400 route des Chappes, BP 167 06903 SOPHIA ANTIPOLIS, FRANCE

PR-1 proteins are ubiquitously plant defense factors secreted in response to pathogen infections. Their accumulation in the extracellular space is the major quantitative change observed in distal, uninfected plant tissues which may develop, subsequently to an hypersensitive response (HR), a systemic acquired resistance (SAR). PR-1 genes are also regulated by developmental signals. During tobacco floral development, PR-1 proteins are expressed in floral tissues and in healthy leaves through a SA-dependant pathway, indicating an involvement not only in defense but also in development. Although these proteins present an obvious crucial role in defense situations, their function is still unclear. To elucidate the function of the tobacco PR-1a protein for resistance against the oomycete *Phytophthora parasitica*, we constructed transgenic plants for PR-1a gene silencing by PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing). Several independent lines were obtained with a drastically reduced accumulation of PR-1a proteins in response to salicylic acid treatment. The reduction of PR-1a protein level ranged from 70 to 90% compared to non-silenced plants. The silencing is specific of PR-1 genes since PR-2 and PR-5 proteins are accumulated in intercellular space of transgenic plants after salicylic acid treatment. Plants silenced for PR-1a gene do not present any evident developmental phenotype and are affected for resistance to the pathogen. Currently we are investigating the role of PR-1a gene in the expression of SAR, ARR (Age-Related Resistance) and the plant cell death during plant-pathogen interaction.

P-36 ETUDE MOLÉCULAIRE DES INTERACTIONS PRÉCOCES ENTRE *ERWINIA CHRYSANTHEMI* ET *ARABIDOPSIS THALIANA*

JACQUES PÉDRON, YVAN KRAEPIEL, ALIA DELLAGI, ELIZABETH SIMOND-CÔTE, DOMINIQUE EXPERT ET FRÉDÉRIQUE VAN GIJSEGEM

Laboratoire Interactions Plantes-Pathogènes, UMR 217 INRA, INA-PG, Université Paris 6, 16 Rue Claude Bernard, 75231 Paris cedex 05

Erwinia chrysanthemi est une bactérie phytopathogène à large spectre d'hôte responsable de la maladie de la pourriture humide. Actuellement, aucune résistance monogénique à ce pathogène n'a été décrite et, malgré l'activation de processus de défense générale, la maladie se développe chez de nombreuses plantes hôtes dont *Arabidopsis thaliana*. L'objectif de nos recherches est d'identifier et de caractériser des facteurs végétaux nécessaires au développement de la maladie. L'approche que nous avons choisie consiste à rechercher des gènes de l'hôte végétal dont l'expression est modulée de façon précoce lors de l'infection et d'analyser la sensibilité à la maladie des mutants correspondants. L'étude des interactions mises en jeu dans ce pathosystème sera approfondie par l'analyse par mutagenèse dirigée de facteurs bactériens sécrétés, potentiellement impliqués dans les réponses précédemment identifiées. La recherche par cDNA AFLP de gènes différentiellement exprimés chez *A. thaliana* lors de l'inoculation d'un tampon, d'un mutant de biosynthèse du LPS ou de la souche sauvage A470 d'*E. chrysanthemi* nous a permis d'identifier différents gènes potentiellement impliqués dans les interactions précoces entre le pathogène et son hôte. Les protéines codées par ces gènes pourraient participer à des modifications métaboliques (haloacide déhalogénase), de la différenciation cellulaire (protéines de la famille MLO) ou de l'homéostasie cellulaire (sous unité du protéasome RPT2b) induites par la bactérie. Les transcrits de ces gènes s'accumulent entre 20 min et 3h après l'inoculation, alors qu'aucun symptôme macroscopique n'est encore décelable. Nous avons entrepris l'étude de mutants présentant une insertion d'un ADN-T dans les gènes MLO12 et RPT2b. L'étude phénotypique met en évidence une diminution de la sensibilité à la bactérie chez ces mutants; les causes de cette diminution de sensibilité restent à explorer : blocage de la prolifération bactérienne, de la pénétration ou de la progression au sein des tissus végétaux ? Une analyse comparative (génotypes sauvage et mutants) sera menée, en suivant la progression bactérienne par cytologie avec une souche bactérienne exprimant de façon constitutive le gène de la GFP et en analysant la cinétique de prolifération bactérienne, afin d'identifier les étapes de la progression de la maladie auxquelles les gènes mutés participent. Le dernier volet de la caractérisation des gènes modulés vise à identifier les facteurs bactériens à l'origine de cette modulation. Des mutants bactériens affectés au niveau des systèmes de sécrétion (types I à IV) ont été développés, afin d'analyser le rôle de ces facteurs sur les modulations observées de gènes d'*A. thaliana*.

P-37 *ORYZA SATIVA/MAGNAPORTHE GRISEA* : A MODEL INTERACTION FOR THE STUDY OF NON-HOST INTERACTION IN PLANTS

O. FAIVRE-RAMPANT, A. C. BILY, S. BERRI, D. THARREAU, P. SCHWEIZER, J-B. MOREL, J-L NOTTEGHEM, E. GUIDERDONI AND P. PIFFANELLI

CIRAD, Avenue Agropolis 34398 MONTPELLIER, FRANCE

Resistance shown by a plant species to the majority of potentially pathogenic microbes is known as non-host resistance. The events leading to non-host resistance in plants represents one of the least understood phenomena and a remaining challenge in the field of plant-microbe interactions. Non-host resistance also represents one of the most promising defence mechanisms in developing durable resistance against plant pathogens, namely due to its effectiveness against a broad range of pathogen species and its durability in nature compared to race-specific R gene-dependent resistance. Rice-*Magnaporthe grisea* is a model pathosystem for race-specific cereal disease resistance study. At the species level, *Magnaporthe grisea* attack more than 50 monocots. However, at the strain level, this fungus exhibits a narrow host spectrum. We are currently developing a biological model using rice cultivars and several non-host *M. grisea* strains (pathogenic on wheat and maize) to elucidate mechanisms implicated in non-host interaction. Cytological analysis will help us to pinpoint where the fungus is blocked in rice- *M. grisea* non-host interactions. Transcriptome analyses will enable us to identify non-host differentially expressed genes. A reverse genetic strategy is underway to target rice T-DNA insertion mutants (Genoplante) that could be potentially affected in non-host resistance. It is expected that this model will shed some light into the genetic basis of non-host resistance defining the signalling and effectors components involved in these phenomena in rice and applicable to other cereal species.

P-38 IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES INDUCED IN RICE BY *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE* BY SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION AND MICROARRAY ANALYSIS.

CAROLINA GONZALEZ, MAURICIO SOTO, BENOÎT PIÉGU AND VALÉRIE VERDIER

IRD-CNRS-Université de Perpignan, 52 avenue de Villeneuve 66860 PERPIGNAN, FRANCE

Bacterial leaf blight (BLB), caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is one of the most important disease of rice in irrigated rice environment causing as high as 20-80% yield reduction in severe epidemics. The most effective approach to control BLB is the use of resistant varieties. Therefore, identification of genes associated with defense responses is one of most critical steps leading to the elucidation of disease resistance mechanisms in rice. The objective of our work was to identify genes associated with rice defense response to *Xoo* combining suppression subtractive hybridization (SSH) and microarray analysis. For this, we focused on two rice species (*O. glaberrima* and *O. sativa*) known to be resistant and moderately resistant to *Xoo*, respectively. For SSH library construction we use as treatment a pool of cDNA obtained from infected plants and collected at different time-points and as control a pool of cDNA obtained from healthy plants (water inoculated). We generated 1536 forward and reverse SSH cDNA clones from each species. The cDNA microarray with 6144 elements was constructed to confirm the differential expression of the clones identified from our subtractive libraries and potentially involved in rice defense responses. Several genes were identified as differentially expressed using this approach. Functional genomic tools such as subtractive libraries and microarray give a comprehensive overview of the molecular basis of the rice defense response to pathogen attack and represent a new source of genes that are likely involved in BLB resistance.

P-39 ANALYSE GLOBALE DES GÈNES EXPRIMÉS AU COURS DE L'INFECTION DU RIZ PAR LE CHAMPIGNON PATHOGENE MAGNAPORTHE GRISEA

AURÉLIE DARCHIS, ARNAUD LAGORCE, DIDIER THARREAU, JEAN-BENOIT MOREL, JEAN-LOUP NOTTEGHEM ET MARC-HENRI LEBRUN

Bayer Crop Science-CNRS, 14/20 rue Pierre Baizet 69263 LYON CEDEX, FRANCE

Le pathosystème *Magnaporthe grisea* – riz est un excellent modèle pour étudier le processus infectieux fongique au niveau moléculaire. En effet, ce champignon est responsable d'une importante maladie foliaire du riz : la pyriculariose. *M. grisea* met en place des programmes d'expression géniques spécifiques de chaque étape de l'infection qu'ils restent encore à approfondir. Grâce aux progrès de la génomique et dans le but de faire progresser les connaissances utiles pour l'amélioration des plantes cultivées, Génoplante a récemment développé un outils d'analyse transcriptionnelle permettant de caractériser un grand nombre de gènes induits ou réprimés chez le cultivar de riz résistant IR64 possédant le gène de résistance *Pi33*, lors de l'infection par une souche virulente de *M. grisea* (isolat PH14) ou une souche avirulente (isolat PH14-ACE1). Cette étude de génomique fonctionnelle a été réalisée à l'aide de puce à ADN développées par Agilent et représentatives de 14 000 gènes de *M. grisea* et 7 000 gènes de riz (EST infection). Notre analyse s'est focalisée 5 jours après l'inoculation lors de l'apparition des symptômes et de la prolifération active du champignon dans la plante. La validation des résultats de mesure de l'expression des gènes de *M. grisea* obtenus de la puce Agilent a été réalisée par une méthode indépendante de PCR quantitative en temps réel (Light Cycler, Roche). Cette stratégie s'est avérée reproductible et a permis de valider l'expression de 75% d'un échantillon de gènes candidats exprimés au cours de l'infection. En outre, l'expression de ces gènes candidats a également été mesurée dans les différents tissus du développement fongique (spore, appressoria, mycélium). Une analyse bio-informatique rassemblant les gènes présentant des profils d'expression comparables (clustering) a permis de classer ces gènes comme étant soit des gènes constitutifs, soit spécifiques de l'infection, soit à la fois spécifiques de l'infection et du développement fongique. Afin d'estimer le rôle et l'importance fonctionnels de ces gènes candidats dans le processus infectieux, leur expression respective seront éteintes ou atténuées. La délétion par remplacement de gènes pouvant être laborieuse au niveau de certains locus à cause d'une recombinaison homologue faible, nous avons tenté de mettre en place une stratégie d'extinction des gènes par ARN interférence. Cette approche, consistant en la production d'une structure en épingle à cheveux guidant la dégradation des ARNm, a tout d'abord été appliquée aux gènes de pathogénie connue *PLS1* et *BIP1*. Le but de la comparaison remplacement de gène / ARN interférence est d'identifier laquelle de ces deux stratégies est la plus adaptées à l'identification de gènes impliqués dans le processus infectieux. Alors que le remplacement des gènes *PLS1* et *BIP1* aboutit à des souches non pathogènes, leur extinction par ARN interférence n'induit qu'une réduction significative (de 50 à 90%) de la pathogénicité indiquant la difficulté à éteindre complètement l'expression d'un gène par ARN interférence.

P-40 ACTIVATION DES RÉACTIONS DE DÉFENSE PRÉCOCES ET TARDIVES CHEZ LE TABAC, LA TOMATE ET LA POMME DE TERRE EN RÉPONSE AUX LPS PURIFIÉS D'ERWINIA CAROTOVORA ATROSEPTICA ET PSEUDOMONAS CORRUGATA.

SABINE DESENDER, FLORENCE VAL, OLIVIER KLARZYNSKI, PHILIPPE POTIN ET DIDIER ANDRIVON

INRA, domaine de la motte 35653 LE RHEU

Les lipopolysaccharides (LPS), composants ubiquitaires de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, sont directement impliqués dans les interactions plantes/pathogènes. Ce sont des molécules complexes, tripartites et amphipatiques capables de minimiser la réponse hypersensible et d'induire les réponses de défense chez les plantes. Malgré les connaissances acquises depuis quelques années sur les principes moléculaires de la résistance des plantes aux maladies, les mécanismes de transduction du signal en réponse aux LPS, en particulier dans les systèmes compatibles, sont très peu connus. Nous avons donc choisi d'étudier le rôle de LPS de bactéries phytopathogènes dans l'activation des mécanismes de défense chez trois espèces de Solanacées (Tabac BY, Tomate MSK8, Pomme de terre cv. Bintje et cv. Kerpondy) en cultures cellulaires. Les LPS sont extraits d'*Erwinia carotovora* atroseptica (Eca, bactérie pectinolytique pathogène de pomme de terre) et de *Pseudomonas corrugata* (Ps, bactérie non pectinolytique pathogène de tomate). Aucun des deux types de LPS n'induit la formation de formes activées de l'oxygène chez les 4 Solanacées, contrairement à la laminarine (b1-3 glucane extrait d'algues brunes) qui induit la production de H₂O₂ chez le tabac et la pomme de terre cv. Bintje uniquement. De plus, les deux LPS (LPSEca et LPSPs) conduisent à une acidification du milieu extracellulaire des quatre cultures, alors que la laminarine induit une alcalinisation de ce milieu. Chez les cellules de tomate et de tabac (de façon moins importante), les LPSEca et LPSPs (200 et 400 µg/ml) induisent une stimulation forte et transitoire de l'activité lipoxygénase (LOX, enzyme du métabolisme des oxylipines). La laminarine, quant à elle, induit une augmentation de l'activité LOX progressive jusqu'à atteindre un plateau. Ni les LPS, ni la laminarine induisent l'activité LOX chez la Pomme de terre, contrairement à la harpine N (protéine effectrice d'*Erwinia amylovora*) et au filtrat de culture de *Phytophthora infestans*, utilisés comme marqueurs positifs d'activité des cellules. Ces résultats suggèrent que les LPS et la laminarine sont perçus différemment par les Solanacées et qu'ils n'activent pas les mêmes réactions de défense chez les plantes. De plus, ils suggèrent que la perception des LPS dépend plus du type d'hôte que du type d'interaction (compatible ou incompatible). Afin de détailler les mécanismes d'induction des réactions de défense, une étude pharmacologique utilisant des inhibiteurs de différentes voies de défense chez les plantes est en cours chez la tomate. Les premiers résultats semblent confirmer que la transduction du signal est différente selon la perception du LPS ou de la laminarine.

P-41 MÉCANISMES DE DÉFENSE IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE DU PALMIER DATTIER VIS-À-VIS DE FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. ALBEDINIS, AGENT DE LA MALADIE DU BAYOUD.

C. EL MODAFAR, A. ZIOUTI, E. EL BOUSTANI, A. TANTAOUI

Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech, Boulevard A. Khattabi, B. P. 549 40000 MARRAKECH, MAROC

La fusariose vasculaire du palmier dattier (appelée communément bayoud) causée par *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* (*Foa*) constitue une menace sérieuse pour la culture du palmier dattier. La lutte génétique représente actuellement la seule alternative pour enrayer cette maladie. Le programme d'amélioration du palmier dattier au Maroc a pour objectif la création par croisements dirigés de palmiers à la fois résistants et présentant des dattes de bonne qualité. Le présent travail fait le point sur les principaux résultats obtenus dans ce domaine. Ainsi, Le palmier dattier développe divers mécanismes de défense vis à vis de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* (*Foa*), agent du bayoud. Selon leur mode d'intervention dans la stratégie de défense de l'hôte, ces mécanismes peuvent être distingués en une composante mécanique (lignine, phénols estérifiés à la paroi, thyllose) et une composante chimique (phytoalexines, phytoanticipines, postinhibitines, polyphénols pariétaux, flavanes, PR-protéines). Ainsi, l'inoculation des racines du palmier dattier par *Foa* se traduit par l'induction de l'accumulation de phytoalexines. L'implication des phytoalexines dans la résistance du palmier dattier est liée à la rapidité et à l'intensité de leur accumulation à des doses fongitoxiques durant les premiers stades de la pathogénèse. Une phytoanticipine identifiée à l'acide caféoylshikimique s'accumule également à des teneurs élevées au niveau des racines des cultivars résistants et génère par hydrolyse (acide caféique) et par oxydation (quinones) des postinhibitines. La phytoanticipine et les postinibitines inhibent directement et indirectement la croissance et le développement de *Foa* d'une part, l'activité et la production de ses enzymes hydrolytiques (polygalacturonases, pectinéméthyl-estérases, polygalacturaonate trans-éliminases, cellulases et protéases) d'autre part. Par ailleurs, deux mécanismes de défense constitutifs de la paroi sont mis en évidence chez les cultivars résistants. Au cours des premiers stades de la pariétolyse, un mécanisme mécanique, faisant intervenir la lignine et les phénols pariétaux, limite l'action des hydrolases fongiques sur la paroi cellulaire de l'hôte. Un deuxième mécanisme chimique intervient à des stades plus évolués pour inhiber la production des enzymes hydrolytiques parasites. L'induction de ces mécanismes de défense est précoce et intense chez les cultivars résistants alors qu'elle est tardive et faible chez les cultivars sensibles. Ces mécanismes de défense dépendent du niveau d'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme clé du métabolisme phénolique. La réponse post-infectionnelle de l'activité PAL des racines des cultivars résistants est plus rapide et plus importante que celle des cultivars sensibles. L'induction de l'activité PAL est liée à un éliciteur glucidique présent dans la paroi mycélienne de *Foa*. Cet éliciteur induit des réponses identiques de l'activité PAL chez les cultivars résistants et sensibles. La réponse différentielle de l'activité PAL à l'infection et à l'élicitation semble être liée à une suppression de son induction chez les cultivars sensibles par un suppresseur protéique soluble produit constitutivement par le pathogène.

P-42 ETUDE DU RÔLE DES GÈNES PR-10 DANS LES RÉACTIONS DE DÉFENSES DU POMMIER ET CARACTÉRISATION MACRO- ET MICROSCOPIQUE DE DIFFÉRENTS CAS D'INTERACTIONS AVEC DES CHAMPIGNONS

B. GUEYE⁽¹⁾, M CHEVALIER⁽³⁾, L PARISI⁽²⁾, C CAMPION⁽¹⁾, P SIMONEAU⁽¹⁾, P POUPARD⁽¹⁾

(1) UMR Pathologie Végétale, UFR Sciences, Université d'Angers, 2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex 01

(2) Unité de Pathologie Végétale, INRA Centre d'Angers, 42 rue G. Morel, BP 57, 49071 Beaucouzé Cedex.

(3) UMR Genhort Unité d'Amélioration des Espèces Fruitières et Ornementales, INRA Centre d'Angers, 42 rue G. Morel, BP 57, 49071 Beaucouzé Cedex

Parmi les PR-protéines, la famille PR-10 comprend des protéines acides intracellulaires dont l'activité biologique reste à identifier pour la plupart des espèces végétales, dont le pommier. Néanmoins pour quelques espèces, il a été montré que les PR-10 pourraient présenter une activité de liaison, voire de transport de différentes molécules (cytokinines, phytostéroïdes) (1) ou une activité ribonucléolytique (2). L'implication des PR-10 dans les mécanismes de défense des plantes est suggérée par de nombreuses références bibliographiques. Chez le pommier, nous avons précédemment montré que l'expression de différents gènes PR-10 est inductible par des facteurs abiotiques (éliciteurs chimiques, blessure) ou un stress biotique causé par *Venturia inaequalis*, l'agent de la tavelure (3, 4). L'expression de certains gènes PR-10 étudiés est activée de façon plus importante en cas d'interaction avec une souche avirulente de *V. inaequalis* comparativement à l'interaction avec une souche virulente. Par ailleurs une voie de signalisation impliquant l'éthylène serait mise en jeu dans le cas de l'induction des gènes PR-10 après contamination par la souche avirulente. Cette étude concernant l'expression des gènes PR-10 en réponse à un stress biotique a été élargie à des cas d'interaction non-hôte avec l'étude des situations 'pommier-*Venturia pirina*' (agent de la tavelure du poirier) ou 'pommier-*Alternaria brassicicola*' (agent du Black-spot des Brassicacées); conjointement, la caractérisation de ces différents types d'interaction au niveau macro- et microscopique a permis d'analyser les événements moléculaires étudiés. Les conidies d'*A. brassicicola* sont capables de germer et dans quelques cas un appressorium se différencie mais le champignon est incapable de s'installer dans les tissus foliaires. Dans le cas de *V. pirina*, la germination des conidies et la formation des appressoria n'est pas différente de ce qui est observé lors de l'inoculation avec les conidies de *V. inaequalis*. *V. pirina* provoque de petites réactions nécrotiques en piqûres d'épingle qui s'apparentent à l'hypersensibilité, mais il n'y a pas de présence sous-cuticulaire du stroma contrairement au cas de *V. inaequalis*. L'induction significative de l'expression des gènes PR-10 (niveau transcriptionnel et protéique) est confirmée en présence de *V. inaequalis*, tandis qu'aucune induction n'est observée en situations non-hôtes. L'activation de l'expression des gènes PR-10 en réponse à *V. inaequalis* semble donc spécifique.

(1)Markovic-Housley et al. (2003) J. Mol. Biol. 325 : 433-438

(2) Koistinen et al. (2002) Plant Cell Env. 25 : 707-715

(3) Ziadi et al. (2001) Physiol. Mol. Plant Pathol. 59: 33-43

(4) Poupard et al. (2003) Physiol. Mol. Plant Pathol. 62: 3-12

P-43 RÔLE DES POLYPHÉNOLS DE L'OLIVIER DANS LA DÉFENSE VIS-À-VIS DE VERTICILLIUM DAHLIAE

C. EL MODAFAR¹, E. EL BOUSTANI², B. BOULOUHA³

1. Laboratoire de Biotechnologie et Phytopathologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques Guéliz, B.P. 549, 40 000 Marrakech

2 Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech.

3 UR Amélioration Génétique des Plantes, INRA, Marrakech

La verticilliose, causée par *Verticillium dahliae*, représente actuellement l'un des principaux facteurs limitant la survie de l'olivier. La lutte génétique représente actuellement la seule alternative pour enrayer cette maladie. Pour sélectionner les sujets résistants au sein des populations issues de croisements dirigés, la démarche empirique basée sur des infections expérimentales et l'observation des symptômes est lourde et longue. La démarche rationnelle consiste à comprendre les bases biochimiques et moléculaires des interactions hôte-parasite. Nos travaux s'inscrivent dans ce contexte et ont eu pour objectif premier d'apporter des connaissances sur les principaux mécanismes de défense de l'olivier à la verticilliose. La résistance de l'olivier à la verticilliose semble être liée à des composantes de défense multifactorielles. Des mécanismes de défense constitutifs (phénols solubles et insolubles, lignine) et induits (intensification de la lignification, accroissement des teneurs en phénols solubles et pariétaux, néosynthèses de phytoalexines) sont mis en évidence. Ces mécanismes peuvent être distingués en deux types selon leur mode d'intervention dans la stratégie de défense de l'hôte : (i) Mécanismes mécaniques (lignine, phénols estérifiés à la paroi) qui limitent l'action des enzymes hydrolytiques parasitaires (β -1,4-endoglucanases et polygalacturonases) sur la paroi végétale de l'hôte, (ii) Mécanismes chimiques (phénols solubles, phytoalexines) qui inhibent la croissance et le développement du parasite. Les composés phénoliques interviennent dans la défense de l'olivier vis-à-vis de *Verticillium dahliae* sous trois formes; des formes solubles (phénols solubles, phytoalexines), des formes insolubles (phénols estérifiés à la paroi végétale) et des formes polymérisées (lignine).

Ce travail est soutenu par un projet IFS (D/2616-2F) et un projet PROTARS (P51/03).

P-44 CARACTÉRISATION DE DEUX COPIES HOMÉOLOGUES DU GÈNE *CaWRKY1* INDUIT AU COURS DE LA RÉSISTANCE DU CAFÉIER À L'AGENT DE LA ROUILLE ORANGÉE.

ANNE-SOPHIE PETITOT, DOSS GANESH, ANNE-CLAIRE LECOULS ET DIANA FERNANDEZ

IRD, 911 avenue Agropolis 34000 MONTPELLIER, FRANCE

L'interaction entre le caféier (*Coffea* sp. L.) et le champignon biotrophe *Hemileia vastatrix*, agent de la rouille orangée, est basée sur une relation gène - à - gène. Neuf gènes de résistance ont été identifiés chez l'espèce allotetraploïde *Coffea arabica* et les autres espèces de caféier diploïdes apparentées. En situation d'incompatibilité, une réaction de type hypersensible, caractérisée par la mort des cellules hôtes au niveau du site d'infection, peut être visualisée dès 24 h après l'inoculation du champignon (p. i.). Pour identifier et caractériser les gènes associés à la résistance de *C. arabica*, des banques soustractives ont été réalisées 12, 24 et 48 h p. i. et un catalogue d'EST a été établi. Parmi les gènes candidats sélectionnés par tri différentiel des ESTs, un clone présentant de fortes similarités avec un facteur de transcription de type WRKY a été identifié. L'expression du gène *CaWRKY1* a été analysée par RT-PCR quantitative au cours de cinétiques d'infection. Les résultats ont montré une induction précoce de *CaWRKY1*, dès 9 h p. i., maximale vers 18 h p. i., et une surexpression dans l'interaction incompatible par rapport à l'interaction compatible. Le gène est aussi rapidement induit par blessure et par l'acide salicylique. Afin de caractériser *CaWRKY1*, le clonage de l'ADNc pleine longueur et de la séquence génomique a été réalisé. Deux séquences, dénommées *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b*, ont été isolées. Elles diffèrent essentiellement par des insertions / délétions dans la région 5' non codante et dans les introns. Les protéines putatives *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* (573 aa) possèdent les caractéristiques structurales (domaine WRKY, Leucine zipper) des facteurs de transcription WRKY et se classent dans le groupe II-c des facteurs WRKY d'*Arabidopsis thaliana*. Des amorces permettant de distinguer l'expression des 2 gènes ont été définies. Elles ont permis de montrer et que l'induction des 2 gènes est similaire au cours des cinétiques d'infection par *H. vastatrix* ainsi que suite aux traitements par blessure ou par l'acide salicylique. Les fortes similarités de séquences de *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* suggèrent qu'il s'agit de copies homéologues du gène *CaWRKY1* dans le génome tetraploïde de *C. arabica*. Pour tester cette hypothèse, le clonage et le séquençage des orthologues de *CaWRKY1* dans 6 espèces diploïdes de caféiers ont été entrepris. Les résultats indiquent que les séquences *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* sont fortement apparentées à celles clonées respectivement chez *C. canephora* et *C. eugenioides*, deux espèces qui sont probablement à l'origine de *C. arabica*. Les travaux se poursuivent pour déterminer le rôle de ces gènes au cours de la réaction de résistance du caféier à *H. vastatrix*.

P-45 ETUDE HISTOLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DE LA RÉACTION D'HYPERSENSIBILITÉ DU CAFÉIER (*COFFEA ARABICA*)

ANNE-CLAIRE LECOULS, ANNE-SOPHIE PETITOT, MARIA SILVA, LEONOR GUERRA-GUIMARES, FRANÇOIS ANTHONY, MICHEL NICOLE, DIANA FERNANDEZ

IRD, 911 Av Agropolis, BP 64501 34394 MONTPELLIER CEDEX, FRANCE

Les principales variétés sélectionnées de *C. arabica* (70% de la production mondiale de café) sont sensibles à de nombreux agents pathogènes et en particulier aux nématodes à galles des racines du genre *Meloidogyne* et à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*) qui constituent les contraintes agronomiques majeures dans les principales régions de production (Brésil et Amérique Latine). Afin d'envisager de nouvelles stratégies de lutte contre ces deux parasites et en complément de l'exploitation des sources de résistance naturelles, une approche visant à la compréhension des mécanismes de défense activés chez la plante suite à l'infection a été initiée. Elle a pour objectif de caractériser les processus cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la résistance et d'identifier ainsi les gènes spécifiquement impliqués dans la réponse du caféier à la rouille et aux nématodes. Une étude comparative du déroulement du cycle infectieux en situation compatible et incompatible a été entreprise afin de préciser la chronologie des événements conduisant à l'établissement de la résistance. Une analyse histologique de variétés résistantes de *C. arabica* infectées par *M. exigua* ou par *H. vastatrix* montre que le phénotype de résistance est la réaction d'hypersensibilité (HR). Sur la base de ces observations, des banques soustractives d'ADNc ainsi qu'un catalogue de gènes (EST) spécifiquement impliqués dans la HR lors de l'interaction *H. vastatrix/C. arabica* ont été générés. Un set de 573 ESTs, non redondantes, a été isolé à partir de banques réalisées 12, 24 et 48 heures post-infection. Le criblage différentiel de ces clones et l'analyse de leur expression par RT-PCR semi-quantitative ont conduit à l'identification de 9 gènes de caféier présentant une induction spécifique dans les étapes précoces de la HR. A partir de séquences EST identifiées lors de l'interaction avec l'agent de la rouille, des gènes-candidats ont été sélectionnés et leurs profils d'expression ont été étudiés au cours d'une cinétique d'infection par *M. exigua*.

P-46 EXPRESSION PROFILING OF CASSAVA GENES DIFFERENTIALLY REGULATED DURING *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS* INFECTION USING A MICROARRAY ANALYSIS

CAMILO LOPEZ, MAURICIO SOTO, SILVIA RESTREPO, BENOÎT PIÉGU, RICHARD COOKE, MICHEL DELSENY, JOE TOHME, VALÉRIE VERDIER.

IRD-CNRS-Université de Perpignan, 52 avenue de Villeneuve 66860 PERPIGNAN, FRANCE

A cassava cDNA microarray based in a large cassava EST database was constructed and used to study the incompatible interaction between cassava and *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). 5700 clones from the cassava unigen set were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and printed on the microarray. Hybridization was performed using cDNA from cassava plants (resistant variety MBra685) collected at 12, 24, 48 hours and 7 and 15 days post-infection as treatment and cDNA from mock-inoculated plants as control. A total of 199 genes were found as differentially expressed (126 up-regulated and 73 down-regulated). A greater proportion of genes differentially expressed was observed at 7 days after inoculation. Expression profiling and cluster analyses indicate that in response to inoculation with *Xam*, cassava induces dozens genes, including principally those involved in oxidative burst, protein degradation and pathogenesis-related (PR) genes. In contrast genes encoding proteins that are involved in photosynthesis and metabolism were down regulated. In addition, various other genes encoding proteins with unknown function or showing no similarity to other proteins were also induced. The quantitative real time PCR experiments confirm the reliability of our microarray data and showed that some genes are induced more rapidly in the incompatible than in the compatible reaction.

P-47 RÉACTIONS DE DÉFENSE EN RÉPONSE AUX ÉLICITEURS ÉMIS LORS DE L'INTERACTION OROBANCHE RAMOSA - TOMATE.

LEJEUNE A., CONSTANT S., THOIRON S., THALOUARN P.

Groupe de Physiologie et Pathologie Végétales, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes 2 rue de la Houssinière - BP 92208 44322 NANTES, FRANCE

L'orobanche est une plante holoparasite qui se développe et pénètre dans les racines de ses plantes hôtes. Parmi les végétaux infestés figurent de nombreuses plantes cultivées telles que le tournesol, le colza ou la tomate. Les dégâts occasionnés peuvent aller jusqu'à la perte totale de rendement. Comme cela avait déjà été montré chez *Arabidopsis thaliana* [1,2] la mise en contact de graines germées d'orobanche avec des racines de tomates induit la sur-expression de gènes impliqués dans la défense chez l'hôte. Ce résultat intervient avant même que l'orobanche n'ait envahi les racines et suggère ainsi l'existence de molécules signal. Afin de mieux étudier les signaux impliqués dans cette interaction, un système simplifié sur cultures cellulaires de tomate a été développé. Nous avons pu démontrer l'induction précoce de gènes de défense par des substances sécrétées par des graines germées. Parmi ces gènes, l'un code pour une protéine de défense PR, l'autre pour un récepteur kinase (WAK). Ces gènes sont également induits sur des systèmes racinaires de tomate par des graines d'orobanche germées. Ce résultat pourrait suggérer l'implication d'un récepteur WAK dans ce "dialogue moléculaire". De plus, le système développé sur cultures cellulaires permet de mieux caractériser la réponse de l'hôte. Ainsi, l'activité lipoxgénase (LOX) des cellules de tomate augmente en réponse aux éliciteurs d'orobanche. Cependant, aucune modification de l'activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL) ni de la production d'espèce toxique d'oxygène H₂O₂ n'a été détectée. Cette étude met en évidence l'implication d'éliciteurs de réponses moléculaires et physiologiques sur les cultures cellulaires de tomate au cours des phases précoces de l'interaction orobanche-tomate. Cependant, la nature ainsi que l'origine (exo- et/ou endogène) de ces éliciteurs restent à déterminer.

[1] Vieira Dos Santos et al., 2003. *Phytopathology* 93:451-457.

[2] Vieira Dos Santos et al., 2003. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62:297-303.

P-48 LE MÉTABOLISME DU MANNITOL ET DE L'ASPARAGINE CHEZ OROBANCHE RAMOSA ET *STRIGA HERMONTHICA*.

PHILIPPE SIMIER, PHILIPPE DELAVault ET PATRICK. THALOUARN

Groupe de Physiologie et Pathologie Végétales, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière 44322 NANTES, FRANCE

Contexte scientifique. *Orobancha ramosa* (Orobanchaceae) et *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) sont des plantes parasites de grandes cultures. Leur contrôle est difficile, comme en témoigne l'expansion d'*O.ramosa* sur colza et tabac en Europe (1) et celle de *S.hermonthica* sur céréales en Afrique (2). Ces parasites se greffent au tissu xylémien racinaire de leur hôte pour assurer leur nutrition hydrominérale et organique. Cette dépendance est totale pour *O.ramosa* ; par contre, *S. hermonthica* est photosynthétique après émergence. Notre intérêt se porte sur les voies d'utilisation des composés prélevés chez la plante infestée. Ces conversions métaboliques sont à la base du parasitisme et les enzymes impliquées, si elles s'avèrent spécifiques des parasites, sont des cibles pour une lutte sélective. Le métabolisme du mannitol. *O. ramosa* et *S. hermonthica* prélèvent du saccharose chez leur hôte et le convertissent majoritairement en mannitol, qui constitue un osmoticum majeur. Chez *S. hermonthica*, la synthèse de mannitol est maintenue après émergence et devient la principale voie d'incorporation du carbone photosynthétique (3). L'enzyme essentielle à la production de mannitol est la Mannose 6-Phosphate Réductase (M6PR). Elle est absente chez les principales plantes hôtes. La M6PR est caractérisée chez *O.ramosa* (4) et est codée par un seul gène (OrM6PR), dont l'expression est constitutive (5). Des inhibiteurs de la M6PR ont été caractérisés in vitro (6) ; leur activité in vivo est actuellement testée. Chez *Striga*, une protéine à activité M6PR a été identifiée ; elle est sensible aux inhibiteurs de la M6PR d'orobanche. Les tentatives d'identification du ou des gènes codant pour cette protéine sont actuellement vaines. Le métabolisme de l'asparagine. *S. hermonthica* se développe essentiellement sur des sols pauvres. Les fertilisants azotés réduisent ainsi l'impact de *Striga*, dont la forte sensibilité vis-à-vis du nitrate s'explique par le fait que ce parasite constitue le puits majeur de la sève brute de l'hôte (7). Les feuilles du parasite présentent un ratio N:C élevé, l'azote excédentaire étant majoritairement stocké sous la forme d'asparagine. Néanmoins, cette voie de détoxification est insuffisante sous certains régimes de fertilisation. Une activité asparagine synthétase (AS) a été détectée in vivo chez *Striga*, chez qui l'AS est codée par une petite famille de gènes dont ShAS (8). L'expression de ShAS est parfaitement corrélée à la synthèse d'asparagine dans les feuilles. Des inhibiteurs spécifiques de l'AS sont connus et méritent en ce sens d'être testés sur *Striga*.

- 1- Benharrat et al. (2003) *Phytoma* LDV 564, 24-26
2. Thalouarn P. et Fer A. (1993) *Cahiers d'Agriculture* 2, 167-182
3. Rousset A. et al. (2003) *Plant Biology* 5, 265-273
4. Robert et al. (1999) *Australian Journal of Plant Physiology* 26, 233-237
5. Delavault et al. (2002) *Physiologia Plantarum* 115, 48-55
6. Robert et al. (1999b) *Carbohydrate Letters* 3, 231-238
7. Pageau et al. (2003) *Journal of Experimental Botany* 54, 789-799
8. Simier P. et al. (2005) *Physiologia Plantarum* 135, sous presse

P-49 PARTICULARITÉS BIOLOGIQUES DE L'HOLOPARASITE OROBANCHE ET INTERACTIONS AVEC LA PLANTE HÔTE

PHILIPPE DELAVAUT, PHILIPPE SIMIER, HOCINE BENHARRAT ET PATRICK THALOUARN

Groupe de Physiologie et Pathologie Végétales, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière - BP 92208 44322 NANTES, FRANCE

Quelques espèces d'Orobanche sont de redoutables parasites de racine de plantes cultivées. En Europe, c'est un réel problème sur légumineuses (fève, luzerne, trèfle), oléagineuses (tournesol en Espagne, colza en France) et solanacées (tabac et tomate). Les recherches développées à Nantes par le Groupe de Physiologie et Pathologie Végétales au cours des dix dernières années ont surtout porté sur la caractérisation de spécificités du métabolisme du carbone et de l'azote ainsi que sur l'interaction avec la plante-hôte. Pour ce deuxième volet, des recherches de génotypes résistants, la caractérisation de leur mode de résistance, le déterminisme génétique de la transmission de ces caractères ainsi que le dialogue moléculaire entre les deux protagonistes ont été envisagés en utilisant les modèles les mieux adaptés à chacune de ces problématiques comme par exemple le couple *Arabidopsis* –Orobanche *ramosa*, espèces non cultivées de *Lycopersicon* sp et d'*Helianthus*, lignées recombinantes, lignées d'introgession ou encore haploïdes doublés. La recherche de spécificités métaboliques a abouti à la mise en évidence du rôle important du mannitol comme forme de transport et d'accumulation des glucides dans la plante parasite. Ainsi une enzyme comme la mannose 6 P réductase (M6PR) constitue une cible spécifique pour laquelle des inhibiteurs ont été testés et caractérisés fonctionnellement. La recherche de génotypes résistants a montré pour le tournesol et la tomate, l'intérêt des espèces voisines sauvages et de leurs hybrides avec des variétés cultivées. La caractérisation de leurs modes de résistance montre l'intérêt et la possibilité d'augmenter la résistance horizontale des espèces cultivées alors que des résistances apparemment monogéniques sont rapidement contournées comme c'est le cas pour le tournesol. Ces facteurs de résistance concernent la nature des exsudats racinaires de la plante hôte, les barrières ou renforcements cellulaires ou pariétaux contre la pénétration du parasite jusqu'aux tissus conducteurs ou encore l'induction de nécroses de ses suçoirs. Le dialogue moléculaire entre les deux protagonistes s'établit bien avant la fixation du parasite sur la racine hôte. C'est bien sûr le cas des stimulants de la germination des graines d'orobanche émis dans les exsudats racinaires et des molécules (dont des enzymes pouvant dégrader des composés pariétaux) libérées par ces germinations dont certaines vont éliciter l'expression de gènes pouvant être impliqués dans des réactions de défense. Ainsi chez *A. thaliana* il y a expression de gènes pour la transduction du signal, l'inhibition de PME, la détoxification de ROS, la voie dépendante du jasmonate et le renforcement pariétal dès les premières heures de confrontation (sans contact physique) avec des graines germées d'*O. ramosa*.

P-50 RÉPONSES MOLÉCULAIRES DU TOURNESOL ET D'ARABIDOPSIS THALIANA À DEUX ESPÈCES DE PLANTES PARASITES OROBANCHE CUMANA ET OROBANCHE RAMOSA : MÉCANISMES DE RÉSISTANCE ET RÉSISTANCE NON-HÔTE.

PATRICIA LETOUSEY, CHRISTINA VIEIRA DOS SANTOS, PATRICK THALOUARN ET PHILIPPE DELAVault

Groupe de Physiologie et Pathologie Végétales, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière - BP 92208 44322 NANTES, FRANCE

Les végétaux supérieurs parasites, phytopathogènes peu connus, provoquent chaque année des dégâts considérables sur des plantes cultivées comme le tournesol, le tabac ou la tomate. En France, la situation devient préoccupante pour les cultures de colza et de chanvre textile. Une des méthodes de lutte consiste en l'obtention de variétés culturales résistantes. Cependant, il est indispensable de comprendre quels mécanismes de défense sont mis en jeu lorsqu'une plante hôte est attaquée par une plante parasite. Chez *Arabidopsis thaliana*, hôte sensible du parasite de racine *Orobanche ramosa*, une surexpression de plusieurs gènes de défense a été mise en évidence après quelques heures de contact entre les deux partenaires (1, 2). Parmi les différentes voies de défense existant chez les plantes, celles de l'acide jasmonique et de l'éthylène sont impliquées dans la réponse d'*Arabidopsis* à *O. ramosa*. Une étude similaire a été menée sur le tournesol, en comparant la réponse moléculaire de deux génotypes de tournesol, LR1 (résistant) et 2603 (sensible), à des temps précoces (2 et 8 heures) et tardifs (de 1 à 21 jours) après infestation par *O. cumana*. Une induction plus forte de gènes marqueurs de la voie de l'acide salicylique (SA) est observée pour la lignée résistante LR1, suggérant l'implication de cette voie de défense dans la résistance à *O. cumana*. Cependant, les voies des phénylpropanoïdes, du jasmonate et de l'éthylène sont également rapidement induites mais chez les deux lignées de tournesol. D'autre part, des études histologiques ont montré une production de callose par les cellules racinaires de tournesol en contact avec *O. cumana* après 17 jours d'infestation. Cette production semble plus importante chez le génotype résistante. L'étude de l'expression du gène codant pour la callose synthase est en cours. Parallèlement à ces études, une analyse des réponses moléculaires dans le cas d'une interaction non-hôte a été réalisée. En effet, la résistance non-hôte reste mal caractérisée (3). Ainsi, *O. cumana* ne se fixe pas sur les racines d'*Arabidopsis*. Dans cette interaction dite non-hôte, les mécanismes moléculaires induits par le pathogène non-hôte sont similaires à ceux précédemment obtenus avec *O. ramosa* (1). En revanche, dans le cas de l'interaction non-hôte tournesol / *O. ramosa*, le profil d'induction génique est qualitativement et quantitativement différent de celui observé suite à l'infestation par le pathogène hôte *O. cumana*. Le statut plante cultivée (tournesol) ou sauvage (*Arabidopsis*), et donc la possibilité d'acquisition de mécanismes spécifiques de résistance non-hôte, peut être une explication de cette différence de comportement des deux plantes lors d'une interaction non-hôte.

1- Vieira Dos Santos C. et al., 2003. *Phytopathology* 93, pp 451-457.

2- Vieira Dos Santos C. et al., 2003. *Physiol. mol. plant pathol.* 62, pp 297-303.

3- Thordal-Christensen H., 2003. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, pp351-357.

P-51 ETUDE DE LA RÉSISTANCE À L'OROBANCHE DE 50 LIGNÉES D'INTROGRESSION DE TOMATE

HOCINE BENHARRAT, YASSER EL- HALMOUCH ET PATRICK THALOUARN

Groupe de Physiologie et Pathologie Végétales, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière - BP 92208 44322 NANTES, FRANCE

Parmi les plantes parasites, le genre *Orobanche* provoque des pertes importantes de rendement au niveau de nombreuses cultures. *Orobanche aegyptiaca*, présente sur le pourtour Méditerranéen, s'attaque notamment à la famille des Solanacées ; le genre *Lycopersicon* est l'un des hôtes de ce parasite. Les accessions sauvages de *Lycopersicon* manifestent en général une résistance beaucoup plus marquée au parasite que les génotypes cultivés. Le caractère de résistance développé par *L. pennellii* LA 716 nous a conduit à rechercher des sources de résistance au niveau de différentes lignées d'introgression. Celles-ci ont été construites à partir du parent cultivé *L. esculentum* cv M82 et d'un parent sauvage *L. pennellii*. L'ensemble du génome du parent résistant a ainsi été introgressé dans un ensemble de 50 ILs (Eshed et Zamir, 1995). La résistance à *O. aegyptiaca* est évaluée à l'aide des paramètres suivants ; poids sec d'orobanche, nombre total de fixations et d'émergences et pourcentage de tubercules nécrosés. La mesure du poids sec d'*Orobanche* varie selon un facteur 15 entre les lignées les plus sensibles (IL 3-4) et les plus résistantes (IL5-4). La valeur de 0,07 g/ plant observée chez le parent résistant est dans tous les cas dépassée, quelle que soit la lignée IL considérée. Le nombre de fixations par plant est compris entre 5 et 29, exprimant ainsi une importante hétérogénéité de réponse qui se retrouve également au niveau du pourcentage de tubercules nécrosés. Des nécroses sont ainsi observées en grand nombre chez les ILs 10-2, 2-1 et 5-4 et absentes pour les ILs 2-5, 2-6, 9-1. Si la majorité des lignées permet à l'*Orobanche* d'accomplir son cycle de développement jusqu'au stade émergence, certaines d'entre elles n'en supportent qu'un faible nombre (IL 4-3, 5-4, 9-3, 12-1). L'ensemble des résultats obtenus en serre nous a permis de sélectionner les lignées les plus résistantes à l'*Orobanche* et de réaliser des co-cultures hôte / parasite, in vitro. Cette étude a confirmé les caractères de résistance développés par les lignées 5-4 et 5-5 : un fort pourcentage de nécrose des tubercules fixés et un faible taux d'émergence. Ces premiers résultats suggèrent donc l'implication du chromosome 5 de *L. pennellii* dans le phénomène de résistance au parasite. Des études histologiques confirment d'autre part la résistance développée par l'IL 5-4.

Eshed et Zamir, 1995, An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and the mapping of yield associated QTL. *Genetics*, 141 :1147-1162

P-52 BASES MOLÉCULAIRES DE LA RÉPONSE DE LA PLANTE À L'INFECTION PAR LES MOLLICUTES DANS DEUX PATHOSYSTÈMES: TOMATE/PHYTOPLASME DU STOLBUR ET PERVENCHE/*SPIROPLASMA CITRI*.

(1) PASCALE PRACROS, SANDRINE EVEILLARD, AURÉLIE ANDRÉ, SYBILLE DURET ET JOËL RENAUDIN, (2) MICHEL HERNOULD, MICHAËL MAUCOURT, ANNICK MOING, ARMAND MOURAS, ET DOMINIQUE ROLIN

1 INRA,, 2 Université de Bordeaux, 71 avenue Edouard Bourlaux, BP81 33883 VILLENAVE DORNON CEDEX, France

Les mollicutes phytopathogènes, phytoplasmes et spiroplasmes, se multiplient exclusivement dans les tubes criblés du phloème où ils sont introduits par leurs insectes vecteurs (cicadelles ou psylles). La réaction de la plante à l'infection se traduit, entre autres, par des jaunisses foliaires, des modifications du développement végétatif (nanisme) et floral (stérilité). L'objectif est de déterminer par quels mécanismes moléculaires la multiplication du mollicute dans les tubes criblés interfère avec la physiologie normale de la plante et induit l'apparition des symptômes caractéristiques de la maladie. Dans le pathosystème tomate (*Lycopersicon esculentum*)/phytoplasme du stolbur, deux approches ont été menées: une analyse globale par la technique des microarrays, et une approche ciblée par RT-PCR semi-quantitative et hybridation in situ pour détecter et quantifier les transcrits de gènes candidats. La similitude entre les symptômes observés sur les plantes infectées par le phytoplasme et les anomalies florales présentées par certains mutants *d'A. thaliana* a orienté le choix vers les gènes impliqués dans l'induction et le développement floral. Nous avons montré que l'infection par le phytoplasme du stolbur se traduit, chez la tomate, par une dérégulation de l'expression de ces gènes. En particulier, les gènes *LeWUSCHEL*, *LeCLAVATA1*, et *LeDEFICIENS* sont réprimés alors que *FALSIFLORA* (FA) est activé. Chez *A. thaliana*, *LEAFY* (dont FA est l'orthologue) est activé par une augmentation de la concentration en sucres. Une telle augmentation a été décrite dans les plantes infectées par divers phytoplasmes. Dans la pervenche infectée par *S. citri*, les analyses RMN confirment l'existence d'un déséquilibre carboné et, en particulier, une accumulation de glucose. Cette accumulation n'est pas observée lorsque les plantes sont infectées par un mutant non pathogène. L'expression des gènes clés du métabolisme des sucres tels que ceux des invertases et sucrose synthases est actuellement étudiée dans les deux pathosystèmes. Outre le signal sucre, la méthylation de l'ADN pourrait être à l'origine de la répression de l'expression des gènes *LeWUSCHEL*, *LeCLAVATA1*, et *LeDEFICIENS*. En accord avec cette hypothèse, les microarrays ont révélé, dans la tomate infectée par le phytoplasme du stolbur, une activation de la transcription d'une chromométhylase et d'une méthyltransférase. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR semi-quantitative. La comparaison de la méthylation des gènes du développement floral dans les tomates saines et infectées par le phytoplasme du stolbur est en cours.

P-53 RESISTANCE OF *MEDICAGO TRUNCATULA* TO *PHOMA MEDICAGINIS*

NACEUR DJEBALI¹, HAYTHEM MHADHBI¹, FÉRID LIMAM¹, THIERRY HUGUET^{2,3} AND MOHMED ELARBI AOUANI¹

1 Laboratoire Interactions Légumineuses Microorganismes, Institut National de Recherche Scientifique et Technique, BP 95, 2050 Hammam-lif, Tunisie.

2 Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes, CNRS-INRA, BP27, 31326 Castanet-Tolosan, France.

3 Laboratoire Biotechnologies et Amélioration des Plantes, INP-ENSAT, BP 107, 31326 Castanet-Tolosan cedex, France

The survey conducted in Tunisia showed that *Medicago truncatula* is attacked by different pathogenic fungi such as *Uromyces* sp., *Erysiphe* sp., *Phoma medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis* and *Cercospora* sp. We have initiated screens to assess genetic diversity to *Phoma medicaginis* infection in core *M. truncatula* collection. The inoculation of several lines of *M. truncatula* with the isolate BrMt0302Ph1 of *Phoma medicaginis* showed a strong variability in resistance between them. The line TN9.18 and DZA45.5 were highly resistant, with only very limited fungal colonization four days after inoculation. However, the line TN3.23 and F83005.5 were susceptible. Crosses between the two lines TN9.18 and TN3.23 will be performed to analyse the segregation of this character in the progeny. To ascertain if active oxygen species play a role in the pathosystem *P. medicaginis-Medicago truncatula*, the activity levels of two antioxidant enzymes, namely guaiacol-dependant peroxydase (GPX) and super oxide dismutase (SOD), were determined spectrophotometrically in leaves. Results of these experiments will be presented.

P-54 IDENTIFICATION DES QTLS LIÉS À LA RÉSISTANCE PARTIELLE AU MILDIU (*PLASMOPARA HALSTEDII*) ET À LA MALADIE DES TACHES NOIRES (*PHOMA MACDONALDII*) CHEZ LE TOURNESOL

SARRAFI A., R. AL-CHAARANI, G. DECHAMP-GUILLAUME G. ET GENTZBITTEL L.

ENSAT-BAP-18 Ch.de Borde Rouge BP107 31326 CASTANET, FRANCE

Le mildiou et la maladie des taches noires, sont considérés comme les maladies importantes chez le tournesol. L'identification des régions chromosomiques avec des effets sur la résistance au mildiou et à la maladie des taches noires chez le tournesol peut augmenter notre compréhension du contrôle génétique à ces deux maladies. Avec l'identification de QTL, le rôle des régions spécifiques de la résistance et l'interaction entre les gènes de résistance, peuvent être analysés. L'objectif de cette étude est de contribuer à la connaissance génétique de la résistance du tournesol au mildiou en conditions naturelles ainsi qu'à la résistance partielle à la maladie des taches noires dans les conditions contrôlées d'une chambre de culture en utilisant des lignées recombinantes (RILs) du croisement 'PAC-2' x 'RHA-266'. L'analyse de variance pour les lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC-2' et 'RHA-266' montre que l'effet du génotype est fortement significatif pour la résistance partielle au mildiou et à la maladie des taches noires. L'héritabilité au sens étroit (0.81 pour la résistance au mildiou et 0.58 pour la résistance à la maladie des taches noires) indique qu'une sélection serait efficace pour la résistance à ces deux maladies. Nous avons identifié quatre QTLs pour la résistance partielle au mildiou et sept QTLs pour la résistance à la maladie des taches noires. Les QTLs sont désignés 'dmr' (la résistance au mildiou) et 'bsr' (la résistance à la maladie des taches noires) suivis par le nombre de groupe de liaison et celui de QTL. Les effets de chaque QTL sont modérés (de 9.30 à 20.20%) pour les deux maladies. Les quatre QTLs détectés expliquent 54.9% de la variance phénotypique totale pour la résistance au mildiou tandis que les sept QTLs détectés pour la résistance au phoma expliquent 92% de la variance phénotypique totale. Les phénotypes transgressifs observés pour les deux maladies pourraient être expliqués par la présence des QTLs de signe opposé chez les deux parents. Les croisements entre les lignées recombinantes qui sont contrastées pour leur résistance au mildiou ou à la maladie des taches noires et l'exhibition du polymorphisme moléculaire dans les régions chromosomiques détectées, pourraient permettre de se concentrer plus et avec précision sur celles d'intérêt. Un travail additionnel est nécessaire pour localiser les QTLs 'dmr' en prenant en considération la position des certains gènes Pl sur la carte génétique du tournesol.

P-55 STRAIN SPECIFIC AND RECESSIVE QTLs INVOLVED IN CONTROL OF PARTIAL RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *MELONIS* RACE 1.2 IN A RECOMBINANT INBRED LINE POPULATION OF MELON

PERCHEPIED L^{1,2}, DOGIMONT C²., PITRAT M².

1 Present adress :LIPM, Chemin de Borde Rouge 31326 CASTANET-TOLOSAN, France

2 INRA Avignon, BP 94 84143 MONTFAVET, FRANCE

Fusarium oxysporum f. sp. melonis (FOM) is responsible for serious economic losses in melon (*Cucumis melo* L.). Two dominant resistance genes have been identified, Fom-1 and Fom-2, which provide resistance to races 1 and 2 and races 0 and 1, respectively. But race 1.2 overcomes these resistance genes and is further divided into 1.2y, which induces yellowing symptoms before the death of the plants, and 1.2w which produces wilting and death without yellowing symptom. A partial resistance to FOM race 1.2 has been found in some Far-Eastern accessions. A previous inheritance study confirmed that the resistance to FOM race 1.2 is under polygenic control. A genetic map of melon was constructed in order to tag FOM race 1.2 resistance with DNA markers on a recombinant inbred line population, derived from a cross between resistant (Isabelle) and susceptible (Védrantais) lines. Artificial root inoculations on plantlets of this population were done using two strains, a wilting and a yellowing one. The combination of phenotypic and genotypic data allowed to identify nine quantitative trait loci (QTL). These QTLs were detected on five linkage groups by composite interval mapping. They explained between 42% and 66% of the total variation. Colocalizations between QTLs and resistance gene homologues and resistance genes, such as Fom-2, were observed. A strain specific QTL was detected and some QTLs seemed to be recessive.

P-56 DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LES INTERACTIONS ARABIDOPSIS THALIANA / POTYVIRUS

SICARD O., HOUVENAGHEL M.C., EYQUARD J.P., MAUDUIT T., RONCORONI M., LANSAC M., LE GALL O., DECROOQ V. ET REVERS F.

INRA, BP 81 33883 VILLENAVE DORNON,

Dans le but de caractériser des facteurs moléculaires de virus et de plantes impliqués dans les interactions plantes / Potyvirus, deux pathosystèmes ont été développés : *Arabidopsis thaliana* / LMV (Lettuce mosaic virus) d'une part et *Arabidopsis thaliana* / PPV (Plum pox virus) d'autre part. Un criblage de plusieurs accessions d'*Arabidopsis* avec 3 souches de LMV et 5 de PPV a été réalisé et a permis de mettre en évidence une large variabilité de phénotypes obtenus. Dans le cas de l'interaction avec le LMV, 7 groupes de sensibilité ont été obtenus (Revers et al., MPMI, 2003) et 3 phénotypes de résistance ont été plus particulièrement étudiés. Tout d'abord, l'accession Cvi (« Cap Verde Island »), pour laquelle un blocage précoce du virus est observé présente un gène de résistance récessif, *rlm1*, cartographié sur une région de 700 kb sur le chromosome 1. Pour réduire cet intervalle, l'analyse de nouvelles lignées recombinantes et le criblage d'une population F2 est en cours. Chez l'accession Col (Columbia), le blocage du mouvement à longue distance de l'isolat LMV-AF199 semble dépendant des gènes *Rtm1*, *Rtm2* et *Rtm3*. L'identification d'isolats de LMV capables d'infecter Col en systémie permet aussi d'envisager la caractérisation du déterminant viral et de préciser son interaction avec les gènes *Rtm*. Enfin, concernant l'accession Nd (Niederzenz), le déterminant viral du contournement de la résistance vis-à-vis de l'isolat LMV-0, qui se caractérise par un blocage du mouvement à longue distance du virus, se situe dans la VPg. L'analyse de la F1 issue du croisement entre Nd x Landberg (Ler), accession sensible au LMV, montre que la résistance serait à déterminisme récessif. Dans le cas de l'interaction avec le PPV, les souches M (Marcus) et D (Dideron) testées sont capables de contourner les gènes *Rtm* mais pas la souche EA (El Amar). Des symptômes sont observés sur Ler infecté par l'isolat R de la souche D. Les déterminants génétiques de la symptomatologie sont en cours d'analyse grâce l'étude d'une population F2 et de lignées recombinantes obtenues à partir d'un croisement entre Col, sur lequel aucun symptôme n'est observé bien que le virus soit présent en systémie, et Ler. Des recombinants viraux entre souches M et D servent actuellement à déterminer le facteur viral impliqué dans la formation de ces symptômes. L'analyse préliminaire de ces deux pathosystèmes montre que des gènes différents sont impliqués dans les différents phénotypes observés. Dans le but d'identifier un plus grand nombre de ces gènes, et ainsi d'appréhender le niveau de complexité génétique des interactions plante / potyvirus au niveau de l'espèce, nous avons engagé une étude de criblage d'une « core-collection » d'*Arabidopsis* représentant 96% de la variabilité génétique naturelle de cette espèce avec un ensemble d'isolats de LMV et PPV eux aussi représentatifs de la variabilité génétique de ces virus.

Session D

***Taxonomie, Phylogénie, Etiologie,
Epidémiologie
et Génétique des populations***

P-57 ERWINIA TOLETANA SP. NOV., UNE ENTÉROBACTÉRIE ASSOCIÉE AUX TUMEURS DE L'OLIVIER INDUITES PAR PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. SAVASTANOI

MARION FISCHER-LE SAUX¹, ANA MARÍA ROJAS², JOSE ESTEBAN GARCÍA DE LOS RIOS³, PEDRO JIMENEZ³, PALOMA RECHE³, SOPHIE BONNEAU¹, LAURENT SUTRA¹, FRANÇOISE MATHIEU-DAUDÉ², AND MICHAEL Mc CLELLAND²

1 UMR de Pathologie Végétale INRA-INH-Université, INRA, BP 60057, 49071 Beaucozéd cedex, France

2 Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, CA, USA.

3 Sección de Microbiología, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo, Madrid, Spain.

La tuberculose de l'olivier est une maladie répandue dans toutes les aires de culture de l'olivier (*Olea europaea* L.). Elle est provoquée par *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*. Lors des isolements pratiqués à partir de tumeurs, il est fréquent, voire systématique, d'observer des entérobactéries associées aux colonies de l'agent pathogène. Ces entérobactéries forment des colonies muqueuses, pigmentées ou non en jaune et fréquemment identifiées comme appartenant à l'espèce *Pantoea agglomerans*. A partir de prélèvements effectués dans la région de Tolède (Espagne), les entérobactéries isolées avec l'agent pathogène ont été caractérisées. Neuf souches originales ont été identifiées. Les tests de pouvoir pathogène ont confirmé l'absence de pathogénicité de ces isolats. L'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S a montré qu'ils formaient un groupe monophylétique distinct des espèces les plus proches et qu'ils possédaient la signature du genre *Erwinia*, bien que phénotypiquement plus proche du genre *Pantoea*. Les hybridations ADN-ADN et l'analyse numérique des données phénotypiques ont montré qu'ils se distinguaient nettement des espèces décrites du genre *Erwinia* et de *Pantoea agglomerans*. Le nom *Erwinia toletana* sp. nov. a été proposé pour décrire ces entérobactéries endophytes associées aux tumeurs de l'olivier (souche type CFBP 6631T, =A37T, =ATCC 700880T, =CECT5263 T ; le contenu (G+C) de l'ADN est 52 ± 0.5 mol% .).

P-58 LA NÉCROSE DU PHLOÈME DU TRONC DE L'HÉVÉA (*HEVEA BRASILIENSIS*) : UN EXEMPLE DE MALADIE À ÉTIOLOGIE COMPLEXE.

F. PELLEGRIN, D. NANDRIS, H. CHRESTIN, N. DURAN-VILA

CS 30016, 34988 MONTFERRIER SLEZ IRD, 34 394 MONTPELLIER, FRANCE;
IVIA, 46 113 VALENCIA, ESPAGNE.

La principale contrainte dans les plantations d'hévéa est actuellement la "nécrose du phloème du tronc" (bark necrosis). Contrairement au "Tapping Panel Dryness" (TPD), cette maladie irréversible se propage du collet au panneau de saignée en nécrosant le phloème interne et les vaisseaux laticifères (1). L'extension de la maladie d'arbre à arbre sur la ligne de planting et l'existence de foyers militaient fortement pour l'implication d'un pathogène transmissible mécaniquement, par le couteau de saignée. Les premières investigations étiologiques réalisées dans les années 80 (2) à partir de feuilles, d'écorce et de latex, ont mis en oeuvre des techniques d'isolements, de transmission, de traitements chimiques différentiels, ou d'observations en microscopies optique ou électronique (3). Bien que différents champignons comme *Phytophthora*, *Pythium*, *Colletotrichum*, et *Fusarium*, ou des bactéries aient été mis en évidence, ni leur pathogénicité, ni l'existence de virus ou de mycoplasmes n'ont pu être démontrées. Depuis 2000, compte-tenu des acquis précédents, de nouvelles investigations ont été focalisées sur la recherche de viroïdes (4) ou de virus. De multiples échantillons de feuilles et d'écorces ont été collectés sur plusieurs clones, dans diverses plantations, à différentes périodes de l'année. Les techniques utilisées concernent l'extraction des ARN, l'électrophorèse séquentielle sur polyacrylamide (s-PAGE), la RT-PCR, la DOP-PCR, puis le clonage et le séquençage. Des bandes d'ARN de faibles poids moléculaires (200-400 bp & 1200-1800 bp) ont été mises en évidence. Ces ARN présentaient des analogies structurelles avec des viroïdes ou des ds-RNA, mais aucune corrélation significative ou reproductible n'a pu être établie avec le statut sanitaire des hévéas échantillonnés. Le séquençage des ADNc clonés à partir des ARN jugés intéressants n'a révélé d'homologies qu'avec des levures ou des bactéries non pathogènes. Les tentatives de mise en évidence de phytoplasmes, de virus ou de viroïdes par PCR au moyen d'amorces spécifiques génériques, n'ont pas donné de résultats conclusifs. En complément de ces analyses étiologiques, des essais de transmission de la maladie par greffage et de désinfection systématique du couteau de saignée n'ont pas réussi à mettre en évidence l'implication d'un agent pathogène. Au bilan, toutes les investigations étiologiques sont restées infructueuses, ce qui tendrait à infirmer l'hypothèse d'un agent causal biotique. A contrario, de récents résultats confortent la thèse d'une causalité physiologique plurifactorielle impliquant des stress exogènes (compacités des sols, stress hydrique, exploitation,...) et des problèmes de vascularisation (ou de compatibilité) à l'interface porte-greffe/greffon (5), associés à un dérèglement du métabolisme du cyanure (6).

(1) D. Nandris et al. 1991, Eur. J. For. Pathol. 21:325.

(2) D. Nandris et al. 1991, Eur. J. For. Pathol. 21:340.

(3) M. Nicole et al. 1991, Eur. J. For. Pathol. 21:27.

(4). N. Duran-Vila et al. 1988, J. Gen. Virol. 69:3069.

(5) D. Nandris et al. 2004, Plant Dis. 88(9):1047.

(6) H. Chrestin et al. 2004, Plant Dis. 88(9):1047.

P-59 IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED WITH DIE-BACK OF GRAPEVINE AND THEIR ROLE IN SISTAN REGION

SALARY.M, GHORBANY.M

Université de Zabol- Iran 89187 ZABOL, IRAN

Grapevine is the most important of garden production in Sistan region. Grapevine die-back is one of the most important diseases in this region. This disease has increased, particularly in conditions of drought stress created in recent years. Several factors are causing of grapevine die-back, that diseases caused by fungi are very important. This research was done for identification of causal fungi that are effective in this disease. *Diplodia natalensis*, *Eutypa lata*, *Verticillium dahliae* and *Guignardia bidwelli* have reported die-back causing in other researchs. In this research, in 2001-2002, samples of vitis branches, that showed symptoms of die-back, were collected from grapevine orchards in Sistan region and were transferred to the laboratory. Branch samples were first thoroughly washed and surfaces were sterilized with 1% sodium hypochlorate and then were cultured on PDA and MA medium. Obtained fungi biologically were purified by single spore and hyphal tip methods. Pathogenicity tests were carried out with selected isolates on using detached and undetached branches of Yaggoti cultivar. In this research, *Verticillium sp.*, *Alternaria sp.*, *Asteromella sp.*, *Aspergillus terreus* and one undetected fungus species were isolated from die-back branches of vitis. The results showed that, *A.terreus* created brown tissue in inoculated branches and then reisolated from those, while other isolated fungi did not create those symptoms. Complimentary examinations for demonstration of pathogenicity in this isolate are doing.

P-60 CARACTERISATION DES SOUCHES DE *PYRENOPHORA TERES* AGENT CAUSAL DE RAYURE RETICULÉE PAR LA METHODE RAPD

ALLAMI A., AIT DAOUD, N. BHILILI, M. BENTATA, F. SOULAYMANI, A. BENALI, D. MOUKHTARI, A. KHADMAOUI, A. JAYCHE S

Faculté des Sciences de Kénitra, cité SUNABEL sidi allal tazi kenitra 14000 KENITRA, MAROC

La rayure réticulée est l'une des maladies les plus importantes sur l'orge au Maroc. L'agent causal est *Pyrenophora teres* Drechs. teliomorph, *Drechslera teres* (sacc) Shoem. Beaucoup d'études ont montré des pertes de rendement. Le manque adéquat des variétés résistantes adaptées et la grande variabilité des isolats de *Pyrenophora teres* ont augmenté la prévalence de la maladie. Le développement des outils moléculaires pour la caractérisation des champignons pathogènes devient d'une importance capitale pour : - mesurer le niveau de variabilité du pathogène (diversité génétique) et permettre une analyse de la structure génétique des populations. - Une identifications rapide des sources de virulence. L'interaction hôte pathogène montre que la virulence d'un pathogène varie en fonction de la plante hôte, stade de la croissance et l'environnement. L'étude génétique de 35 isolats de *P.teres* pour la caractérisation moléculaire fait l'objectif de cette étude. L'agent pathogène présente différentes types culturels sur milieu V8 gélosé, et différentes couleur après l'extraction de l'ADN. La couleur n'est pas une critere de virulence. Sur 50 amorces, 13 sont révélée le polymorphismes génétique sur 3 isolats testée (I 5, I 24, I 31).

P-61 *KABATIELLA LINI*, EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE DE CASSURE DU LIN, *LINUM USITATISSIMUM*.

E. CARIOU-PHAM, C. FICHTER, M. BROCHARD

Antenne ITL au CETIOM- Centre de Grignon BP04 78850 THIVERVAL GRIGNON, FRANCE

Kabatiella lini, responsable de la cassure de la tige et de la brunissure sur les plantes de lin, possède un cycle biologique complexe et encore mal connu. En particulier, il existe une réelle controverse sur la source d'inoculum primaire et le mode de dissémination du champignon. Le champignon pourrait être conservé, selon les auteurs, dans le sol et/ou sur les graines. La contamination aérienne d'un champ serait également possible. Afin de déterminer le mode d'infection de la plante, nous avons réalisé des inoculations artificielles et semi-artificielles de *K. lini*. Toutes les inoculations artificielles aériennes ou telluriques ont produit des plantes malades avec des symptômes analogues à ceux obtenus au champ. Néanmoins, leur efficacité est faible. Les inoculations semi-artificielles au champ, révèlent un système d'inoculation efficace : la pulvérisation d'une suspension de spores à une période tardive en végétation qui permet d'obtenir une augmentation de près de 70% du nombre de plantes malades en comparaison avec les témoins. Les graines des parcelles inoculées dans ces conditions ont fait l'objet d'analyses sanitaires. Celles-ci ont permis de détecter la présence de *K.lini* dans les graines en cours de formation. Ce résultat met en évidence un des modes de transmission possible de la maladie.

P-62 ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DU DÉPÉRISSEMENT DE L'AULNE GLUTINEUX DÛ À *PHYTOPHTHORA ALNI*

CLAUDE HUSSON, BÉNÉDICTE THOIRAIN, OLIVIER CAEL, RENAUD IOOS, PASCAL FREY ET BENOÎT MARÇAIS

INRA, rue d'Amance 54280 CHAMPENOUX, FRANCE

En Europe, depuis le début des années 1990, une nouvelle maladie létale est apparue sur les aulnes glutineux le long des cours d'eau. Cette maladie est causée par un Oomycète, *Phytophthora alni*, qui est un hybride interspécifique allopolyploïde. Les dégâts sont considérables et l'espèce est menacée dans de nombreux sites. Le long de la Moselle, 20 à 30% des arbres sont actuellement malades ou morts et il est fréquent que la mortalité annuelle atteigne 5%. Durant l'été 2004, nous avons évalué la distribution et la sévérité de la maladie dans le bassin Rhin-Meuse afin de les corrélérer avec des paramètres environnementaux (caractéristiques de l'aulnaie, de la rivière et du lit majeur) et de déterminer les facteurs de risques. Le but est de mieux gérer la maladie et d'en améliorer le contrôle. Un plan d'échantillonnage a tout d'abord été établi selon les types de cours d'eau et la qualité de l'eau. Par la suite, la visualisation des photographies aériennes de l'Inventaire Forestier National des sites retenus a permis d'en sélectionner 80 dans lesquels la présence d'aulnes est probable. Après enquêtes de terrain, l'analyse statistique des données a porté sur 58 sites localisés sur 40 cours d'eau différents. Il se confirme que la maladie est très largement répandue et est en progression. 17% des arbres étaient malades, 80% des sites prospectés et 78% des rivières étaient infectés. Il apparaît que les principaux facteurs de risques sont liés aux types de cours d'eau : température de l'eau et vitesse du courant, texture du sol. Les aulnaies qui présentent un risque élevé d'infection sont situées le long des cours d'eau des basses vallées de plateaux calcaires et des plaines argilo-limoneuse, à eaux calmes et tempérées, ayant un sol de berge de type limono-argileux. Aucune corrélation n'a pu être montrée avec la qualité de l'eau (et notamment sa teneur en azote) ou la morphologie de la rivière (section courbe ou droite).

P-63 DÉTERMINATION ET SUIVI QUANTITATIF DE LA STRUCTURE D'UNE POPULATION VIRALE COMPLEXE PAR LA TECHNIQUE D'ANALYSE DISCRIMINANTE DE SIGNATURES CLONALES (DACS[®] : DISCRIMINATIVE ANALYSIS OF CLONE SIGNATURE

BAPTISTE MONSION ET STÉPHANE BLANC

UMR biologie et génétique des interactions plante/parasite, CIRAD-INRA-ENSAM, TA 41/K, Campus International de Baillarguet 34398 MONTPELLIER, FRANCE

Comment obtenir des informations quantitatives – sans l'hybridation moléculaire et sans la Q-PCR – sur la structure d'une population virale complexe (mélange de plusieurs clones, variants, ou souches) et son évolution ? Notre but était de pouvoir créer des marqueurs génétiques, puis de les identifier et de suivre leur fréquence relative dans une population virale complexe. Différents clones viraux du CaMV (Cauliflower mosaic virus) ont été construits. Chaque construction diffère par une cassette spécifique de 40 pb, insérée à une position identique dans le génome viral. Des solutions virales mixtes, comportant 5 à 6 clones viraux en proportion variable, ont été préparées et soit analysées directement, soit inoculées à des plantes hôtes. Pour l'analyse de ces différentes populations mixtes, nous avons mis en place une technique originale dérivée du DACS (technologie propriétaire développée par GENOME express). Cette technique consiste en un séquençage sur une seule lettre (par exemple A) des produits PCR correspondant à la région de l'ADN viral contenant les cassettes. Du fait de la faible homologie de séquence des cassettes, chaque clone viral possède alors une signature spécifique à ce niveau, avec présence ou absence de A à chaque position de nucléotide. Il existe donc sur l'électrophorégramme un ou plusieurs " pic(s) " spécifique(s) pour chacun de nos marqueurs (signature). Ainsi, nous pouvons très simplement déterminer, par la présence ou l'absence de ces pics spécifiques, la présence/absence de chacun des marqueurs et ainsi, la composition de populations virales complexes. L'obtention de données quantitatives s'effectue par une simple analyse complémentaire du même électrophorégramme. En effet, chaque pic spécifique à un marqueur donné aura une hauteur proportionnelle à la fréquence relative de ce marqueur dans la population. Nous pouvons ainsi, sur un simple produit de PCR amplifié à partir d'une population virale contenant plusieurs clones marqués, obtenir rapidement des informations fiables et reproductibles sur la présence/absence des marqueurs dans la population et sur leur fréquence relative. La mise au point de cette méthode sera présentée sur la base de l'étude des goulots d'étranglement que subissent les populations du CaMV lors de l'invasion de la plante hôte et lors de la transmission par pucerons vecteurs. Nous pensons que cette méthode d'analyse originale pourrait servir au suivi quantitatif de compétitions entre clones viraux de laboratoire (notre cas), ainsi qu'entre des variants ou des souches naturelles de séquence connue, voir même dans certains cas entre différentes espèces virales. Elle peut certainement aussi être appliquée à d'autres parasites et plus généralement à l'analyse populationnelle de divers microorganismes.

P-64 EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES POPULATIONS DU CHAMPIGNON PATHOGENE DU SOL *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI* AU COURS D'UNE MONOCULTURE DE BLÉ

LEBRETON LIONEL, LUCAS PHILIPPE AND SARNIGUET ALAIN

INRA, UMR BiO3P, Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes, Domaine de la Motte, BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex, France.

Le déclin du piétin-échaudage est une réduction naturelle de la gravité de la maladie causée par le champignon *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) observée au cours des monocultures longues de blé. Outre l'implication de la microflore antagoniste, les variations de structure de population de l'agent pathogène pourrait aussi expliquer ce déclin. Pour vérifier cette hypothèse, quatre populations de trente isolats ont été isolées de racines de blé nécrosées à partir d'une première, troisième, quatrième et sixième année de culture de blé. Le dispositif expérimental présente les caractéristiques associées au déclin pour les variables de gravité de maladie et de fréquence de plantes infectées. Les populations de *Ggt* ont été caractérisées à l'aide de marqueurs RAPD et par empreinte AFLP. Dix-sept génotypes multilocus, issus de la combinaison des marqueurs RAPD et AFLP ont été identifiés dans ces populations. Les 120 isolats peuvent être distribués en deux groupes principaux, G1 and G2, confirmés par des valeurs de bootstrap supérieures à 86%. A l'intérieur des deux groupes, chaque population présente un taux d'homologie d'au moins 93 %. Chacun de ces groupes contient des isolats collectés en 1ère, 3ème, 4ème et 6ème année de blé. Cependant, les génotypes du groupe G1 dominant dans les populations de 1ère et 6ème année, alors que les génotypes du groupe G2 dominant largement les populations de 3ème et 4ème année de monoculture. L'agressivité des isolats du groupe G2 est plus grande que celle des isolats du groupe G1. Cette étude montre une structuration des populations de *Ggt* au cours d'une monoculture de blé. La distinction de ces deux groupes constitue une base simple pour réaliser des analyses spatio-temporelles de l'évolution des populations de *Ggt* au cours d'épidémies polyétiques de piétin-échaudage, en particulier au cours du déclin de la maladie. Cette étude a débuté à partir d'échantillonnages réalisés au cours de trois cultures successives de blé.

P-65 ADAPTATION LOCALE DES POPULATIONS FRANÇAISES DE ROUILLE JAUNE DU BLÉ

MAMADOU MBOUP, MARC LECONTE, CLAUDE DE VALLAVIEILLE-POPE, JÉRÔME ENJALBERT

INRA, 1, route de Grignon 78850 THIVERVAL-GRIGNON, FRANCE

Les études de spectre de virulence menées depuis 18 ans sur les populations françaises de rouille jaune du blé (*Puccinia striiformis f.sp. tritici*) ont révélé que le Sud et le Nord de la France présentaient une composition divergente en pathotypes [1]. L'étude de la diversité génétique de ces pathotypes au moyen de marqueurs AFLP et microsatellites a révélé une grande divergence génétique entre un pathotype spécifique du Sud de la France (6E16) et le reste des pathotypes qui appartiendraient à une population Nord-Ouest Européenne. Les populations Sud et Nord de la France seraient donc issues de deux lignées clonales très divergentes [2]. L'échantillonnage régulier du pathotype Sud (6E16) dans le Nord de la France, et vice versa, prouve qu'il n'y a pas de barrière à la migration entre les deux zones géographiques. Et si le pathotype Sud n'a pas un spectre de virulence adapté aux variétés de blé cultivées dans le Nord, les pathotypes Nord, qui possèdent de nombreuses virulences, peuvent attaquer la majorité des cultivars du Sud de la France. Sachant que les épidémies du Nord de la France sont les plus fréquentes, une invasion du Sud de la France par les pathotypes Nord serait attendue. Or, la présence du pathotype 6E16 dans le Sud est stable sur les 20 dernières années. Afin de tester une adaptation différentielle aux conditions climatiques du Sud de la France, les efficacités d'infection et de sporulations des pathotypes Sud et Nord de la France ont été comparés. Les premières expériences ont porté sur l'adaptation à des hautes températures (15-20°C), par opposition aux optimums décrits pour les pathotypes Nord (8-10°C). Les premiers résultats sont présentés.

[1]- Bayles R. A., Flath K., Hovmøller M.S, de Vallavieille-Pope C., 2000. Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe – a case study by the yellow rust sub-group of COST 817. *Agronomie* 20, 7, 805-811.

[2]- Enjalbert J., Duan X., Giraud T., Vautrin D., de Vallavieille-Pope C., Solignac M. 2002. Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis f. sp. tritici*. *Molecular Ecology Notes* 2, 563-565.

P-66 ETUDE DE LA SPÉCIALISATION PARASITAIRE DE *SEPTORIA TRITICI* ROB.EX.DESM, TÉLÉOMORPHE *MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA* (FUCKEL) J.SCHROT SUR BLÉ DUR ET BLÉ TENDRE ET COMPORTEMENT DE QUELQUES VARIÉTÉS

HATTAB S.¹, BOUZNAD Z¹ . ET SAYOUD R²

Institut National Agronomique, Avenue Pasteur, Hassan Badi, 16200 EL HARRACH ALGER, ALGÉRIE

Parmi les productions céréalières, les deux espèces de blé (blé dur et blé tendre) sont les plus importantes en Algérie. Malgré l'aire importante réservée annuellement à ces cultures la production reste faible, très irrégulière, et insuffisante pour couvrir les besoins du pays. Cette situation place l'Algérie comme premier pays importateur de blé dur sur le marché mondial. Plusieurs facteurs sont impliqués, dont les plus importants sont les pratiques culturales, les aléas climatiques, l'utilisation des variétés anciennes à faible rendement et l'état phytosanitaire des cultures. Durant ces dernières années, de nombreuses maladies foliaires sont observées sur les blés et seraient à l'origine d'une diminution des rendements, en particulier la septoriose causée par *Septoria tritici*, est largement distribuée dans les régions céréalières de l'Algérie. Cette maladie est à l'origine d'importants dégâts enregistrés sur les variétés sensibles de blés durs et blés tendres. Face à l'importance des dégâts, et dans l'optique de privilégier une lutte génétique à moyen et long terme, plusieurs travaux ont été menés durant ces dernières années pour évaluer les possibilités d'utilisation de variétés résistantes. Par ailleurs des travaux antérieurs en Algérie et dans le monde rapportent une certaine spécialisation de *Septoria tritici* à l'égard des deux espèces de blé (blé dur et blé tendre). Nos résultats obtenus avec des inoculations croisées, indiquent que cette spécialisation entre isolats de blé dur et isolats de blé tendre sur leur hôte respectif était adaptative et ont montré également une variabilité pathologique des isolats obtenus de différentes régions de culture du blé tendre et blé dur dans le pays avec l'existence aussi d'isolats très virulents et agressifs. Quant au comportement variétal, des essais réalisés en serre et in vitro nous ont permis de distinguer parmi les variétés cultivées en Algérie, celles qui sont résistantes et celles qui sont sensibles dans nos conditions de cultures. Les résultats montrent que cette variabilité est liée également à l'agressivité et la virulence des pathotypes existant en Algérie. En conclusion, nos travaux confirment une spécialisation parasitaire et une variabilité du *Septoria tritici* au niveau des deux espèces de blé, comme ils montrent la possibilité d'une amélioration des rendements de ces cultures par une utilisation des variétés résistantes ou tolérantes à cette maladie.

P-67 STRUCTURE GÉNOTYPIQUE ET PHÉNOTYPIQUE DE POPULATIONS DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* ISSUES DE VARIÉTÉS DE POMME DE TERRE PRÉSENTANT DIFFÉRENTS TYPES OU NIVEAUX DE RÉSISTANCE

JOSSELIN MONTARRY, ROSELYNE CORBIERE, SOPHIE LESUEUR, ISABELLE GLAIS, DIDIER ANDRIVON

INRA, Domaine de la motte 35653 LE RHEU, FRANCE

Comprendre la sélection exercée par la plante hôte et ses conséquences sur la structure des populations pathogènes est essentiel à la gestion des maladies des plantes, que ce soit par la création variétale ou par l'identification des meilleures stratégies de déploiement de ces variétés dans le temps et l'espace. La réponse à la sélection exercée par les gènes majeurs, impliqués dans les résistances race spécifiques, a été démontrée pour de nombreux pathosystèmes dans le passé, y compris le mildiou de la pomme de terre. En revanche, peu d'éléments sont disponibles concernant la sélection exercée par une résistance quantitative, partielle, supposée race non-spécifique. Nous cherchons ici à savoir si les patrons adaptatifs des populations de *Phytophthora infestans* sont similaires pour ces deux types de résistance, et si ils sont reliés au polymorphisme génotypique déterminé avec des marqueurs moléculaires. Pour ce faire, des isolats français de *Phytophthora infestans* ont été échantillonnés deux années consécutives (2001 et 2002) sur des variétés de pomme de terre présentant différents niveaux de résistance (Bintje – variété sensible, Désirée – variété partiellement résistante et Naturella – variété à résistance spécifique conférée par le gène R2), et caractérisés biologiquement pour le type sexuel et le pouvoir pathogène (virulence et agressivité) et génétiquement en utilisant des marqueurs moléculaires (AFLP). Les populations locales étudiées sont clairement structurées par l'hôte pour la virulence : seuls les isolats originaires de Naturella sont capables d'attaquer cette variété. Mais ces populations sont également structurées par l'hôte pour l'agressivité : les isolats originaires du cultivar sensible (Bintje) sont les plus agressifs tant sur Bintje que sur Désirée, sans adaptation différentielle entre ces deux génotypes. La diversité génotypique observée est faible, ce qui suggère que la collection est constituée de quelques lignées clonales proches, et que la reproduction sexuée ne joue pas de rôle dans ces populations (malgré la présence conjointe des deux types sexuels A1 et A2 sur la parcelle en 2002). Aucune corrélation n'a été détectée entre le pouvoir pathogène et le groupe AFLP des différents isolats. Ces données indiquent que l'adaptation pour le pouvoir pathogène a lieu dans les populations de *Phytophthora infestans*, mais que les patrons adaptatifs dépendent du type de résistance considéré. Il est donc indispensable d'établir des stratégies de déploiement des variétés adaptées à ces patrons adaptatifs. Pour ce faire, une approche par modélisation a été élaborée et est en cours de développement.

P-68 ECOLOGIE D'UN COMPLEXE DE PYTHIUM ASSOCIÉS À LA CAROTTE : ÉVOLUTION DE LA DIVERSITÉ INTER-SPÉCIFIQUE APRÈS INFESTATION D'UN SOL PAR *P. VIOLAE* ET CONSÉQUENCE SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE DU CAVITY SPOT

FRÉDÉRIC SUFFERT, MICHÈLE GUIBERT, JULIEN BEUZELIN, FRANÇOISE MONTFORT

INRA, Domaine de la Motte 35160 LE RHEU, FRANCE

Les *Pythium*, agents pathogènes majeurs sur racines de carotte, sont responsables du cavity spot. L'objectif de nos recherches est de comprendre la dynamique spatio-temporelle de cette maladie. Mais l'interprétation de données d'épidémiologie quantitative obtenues après infestation artificielle de sols naturels est parfois complexe, à l'exemple de celles issues de trois années d'expérimentation au champ (2001 à 2003) : *P. violae*, espèce pathogène introduite en 2001 et localement non endogène, n'a pas été la seule responsable des attaques. Le travail présenté ici illustre l'évolution d'un complexe de *Pythium* par l'étude de ce cas particulier sous un angle « écologique ». Le complexe est initialement constitué de 5 à 6 espèces pathogènes (caractérisées par PCR et RFLP), dont *P. violae*, chacune étant isolée à partir de symptômes classiques de taches en creux. Cette diversité inter-spécifique (mesurée au travers d'un indice de Shannon normalisé) diminue au cours du temps pendant les trois années de monoculture. L'espèce introduite *P. violae* prend le dessus la première année et est responsable de la majeure partie de l'épidémie : le caractère « massif » de l'infestation peut expliquer cette domination. La seconde année, on retrouve *P. violae* dans des proportions moindres et c'est *P. sulcatum*, naturellement présent dans les sols, qui prédomine. La présence de *P. sylvaticum / irregulare*, *P. intermedium* et *P. coloratum / dissotocum* (ainsi que quelques autres espèces peu représentées) reste anecdotique (entre 10 et 20 %). La troisième année, *P. violae* a totalement disparu ; *P. sulcatum* a été largement sélectionné (> 90%). Les caractéristiques biologiques des 4 espèces pathogènes les plus représentées permettent d'expliquer l'évolution du complexe : l'étude du pouvoir pathogène montre que *P. violae* et *P. sulcatum* sont les espèces les plus agressives sur carotte et peuvent être considérées ici comme « majeures ». L'optimum thermique de *P. violae* (19°C) est inférieur à celui de *P. sulcatum* (25°C), ce qui peut expliquer les difficultés rencontrées par *P. violae* pour se maintenir entre 2002 et 2003. La survie de l'inoculum, sujet à une décroissance au cours du temps, n'est pas la même pour *P. violae* et pour *P. sulcatum* : l'objectif d'une expérimentation en cours est d'établir qu'à des températures extrêmes (5°C et 27°C), la capacité de survie de *P. violae* est plus faible que celle de *P. sulcatum*. L'analyse de l'occurrence d'infections multiples (présence de plusieurs espèces sur une même lésion, i.e. co-infection) met en évidence des espèces pathogènes « majeures » et « mineures » au sein du complexe étudié. L'hypothèse d'indépendance des infections par chacune de ces espèces pathogènes « majeures » a été testée et retenue, ce qui justifier l'analyse du complexe pathogène dans sa globalité ou de façon additive, c'est à dire espèce par espèce (en considérant une seule et même dynamique épidémique sans dissocier l'action de chaque espèce.

P-69 IMPLICATION DU MÉTABOLISME DE *BOTRYTIS CINEREA* DANS LA SYNTHÈSE DE GÉOSMINE PAR *PENICILLIUM EXPANSUM* SUR LE RAISIN

STÉPHANE LA GUERCHE, SOPHIE CHAMONT, DOMINIQUE BLANCARD, DENIS DUBOURDIEU ET PHILIPPE DARRIET

Faculté d'Oœnologie, 351 cours de la Libération 33405 TALENCE,

L'une des conséquences organoleptiques associées au développement de la pourriture sur les raisins et préjudiciables à la qualité des moûts et des vins concerne la présence de défauts olfactifs, présentant en particulier des notes fongiques ou moisies terreuses. La plupart des composés volatils responsables de tels défauts ne sont retrouvés qu'au niveau des raisins et dans les moûts. Toutefois, certains composés persistent et peuvent avoir de graves conséquences sur la composante aromatique du vin, comme c'est le cas pour la géosmine (ou trans-1,10-diméthyl-trans-9-décalol), un composé présentant une forte odeur de terre humide. Pendant plusieurs années, la microflore présente sur les baies de raisin contenant de la géosmine a été analysée dans de nombreuses parcelles du vignoble bordelais, du Val de Loire, de Bourgogne et du Beaujolais concernées par ce problème. De nombreux champignons, levures et bactéries ont été isolés. Seuls deux espèces fongiques, *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*, sont omniprésents en proportions importantes sur tous les sites étudiés. Paradoxalement, *P. expansum* produit la géosmine sur milieux de laboratoire (Malt Agar, Czapek) mais pas sur raisin ou jus de raisin. Toutefois, nous avons démontré que la pré-culture de certaines souches de *B. cinerea* sur jus et broyat de raisin permet la synthèse de géosmine par *P. expansum*. L'action préliminaire de *B. cinerea* est donc indispensable à la genèse de géosmine par *P. expansum* sur jus de raisin. Le rôle du métabolisme de *B. cinerea* sur la composition du jus de raisin a également été étudié. La carence en acides aminés résultant du développement de la pourriture grise sur jus de raisin semble être un facteur déclencheur de la production de géosmine par le *Penicillium*. D'autres paramètres liés à l'action de *B. cinerea* doivent aussi être impliqués.

P-70 DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MICROSATELLITES ET APPLICATIONS À LA GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE *MELAMPSORA LARICI-POPULINA*, AGENT DE LA ROUILLE FOLIAIRE DU PEUPLIER.

BENOÎT BARRÈS, CYRIL DUTECH, AXELLE ANDRIEUX, JEAN PINON ET PASCAL FREY

rue d'Amance 54280 CHAMPENOUX, FRANCE

Les marqueurs microsatellites ou SSR (pour Simple Sequence Repeat) sont définis comme des répétitions en tandem de motifs simples possédant entre 1 et 6 paires de bases (ex : [AC] n , [AG] n , [GAT] n ,...). Ce sont des marqueurs neutres, souvent très polymorphes et codominants. Ils sont donc de parfaits candidats pour la réalisation d'études de génétique des populations de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire du peuplier. Cet hémibasidiomycète cause d'importantes pertes de rendement dans les peupleraies cultivées, suite au contournement de plusieurs gènes de résistance largement déployés. C'est le stade urédien dicaryotique qui se développe sur les feuilles de peuplier et que nous étudions au laboratoire. Même si leur nombre semble relativement important en valeur absolue au sein du génome des champignons pathogènes (environ 2500 loci identifiés dans le génome de *Magnaporthe grisea*), les loci microsatellites nécessitent la réalisation d'une banque d'ADN enrichie pour augmenter la probabilité de les identifier. C'est pourquoi nous avons procédé à plusieurs enrichissements de l'ADN avec divers motifs microsatellites. Deux enrichissements ont été réalisés sur membranes (avec les motifs [AC]15 et [AG]15 combinés et [GAC]10), et deux enrichissements ont été effectués à l'aide de billes magnétiques (motifs [TC]10 et [TG]10). Trente cinq paires d'amorces ont été synthétisées et testées sur un panel de 30 souches de *M. larici-populina*, représentatives de la diversité génétique à un niveau local, régional et mondial. Une dizaine de loci polymorphes ont ainsi pu être caractérisés et validés. Le multiplexage des loci microsatellites a été mis au point en jouant sur la taille des loci et les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorochromes. Ces loci ont également été testés sur cinq autres espèces de *Melampsora* spp., et un seul locus c'est avéré transférable aux espèces *M. allii-populina*, *M. medusae* et *M. rostrupii*, avec une taille d'allèle spécifique à chaque espèce. Ce locus semble en outre présenter une hérédité monoparentale, ce qui suggère une origine mitochondriale. Ces marqueurs microsatellites sont actuellement utilisés pour étudier la structuration de la diversité génétique de *M. larici-populina* à différentes échelles. Pour cela nous avons prélevé des populations selon un échantillonnage hiérarchisé emboîté, aussi bien sur peupliers cultivés que sur peupliers sauvages. Dans trois sites différents, cinq arbres ont été choisis et sur chaque arbre ont été prélevés trois rameaux, sur lesquelles ont été échantillonnées trois feuilles. Nous avons ensuite prélevé trois urédies sur chacune de ces feuilles. Au total, une population hiérarchisée emboîtée est donc constituée de 135 individus. Leur génotypage nous permettra de connaître le taux de clonalité aux différentes échelles, de déterminer la structuration de la diversité génétique chez ce champignon et d'identifier plus précisément l'échelle pertinente d'étude d'une population de *M. larici-populina*.

P-71 DIVERSITY AMONG *FUSARIUM OXYSPORUM* ISOLATES ASSOCIATED WITH FLAX WILT RESOLVED BY PCR-RFLP-SSCP ANALYSIS OF FOUR DIFFERENT GENES

B. TISSERANT, L. EL CHARTOUNI, PH. REIGNAULT, J. SANSENE AND R. DURAND

Université du Littoral Côte d'Opale, 17 av Blériot , BP 699 62228 CALAIS CEDEX,

Flax wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum f.sp. lini* is a major problem of flax (*Linum usitatissimum*) cultivation. The control of the disease is based on genetic selection of resistant or tolerant flax cultivar. However, long term experiments show that flax resistance or tolerance decrease with time due to genetic adaptation of the pathogen agent to crop conditions. To understand the genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolated from flax culture, we started to establish a phylogenetic analysis of isolates from various geographical origin as well as other *Fusarium* species. We used a method that combined the advantages of PCR-RFLP and SSCP as a prescreen of 4 genes (b-tubuline, 28S rDNA, ITS, EF-1 elongation factor) before sequence analysis. SSCP method is known to allow the detection up to a single base difference between isolates. Thus, in our study, differences between samples, not detected after PCR-RFLP were highlighted with PCR-RFLP-SSCP. Then, single representative of each unique gene fingerprint will be sequenced, thereby vastly reduce the overall sequencing effort. Our work shows that PCR-RFLP-SSCP analysis of the ITS and 28S genes clearly discriminate between *Fusarium* species whereas analysis of b-tubuline and Elongation Factor genes resolved differences between *Fusarium oxysporum f.sp. lini* from different geographical origin.

P-72 MALADIE DU HUANGLONGBING DES AGRUMES : DIVERSITÉ DE L'AGENT CAUSAL « CANDIDATUS » LIBERIBACTER BASÉE SUR LES VARIATIONS D'UN GÈNE CODANT POUR UNE PROTÉINE DE LA MEMBRANE EXTERNE

BASTIANEL C., GARNIER-SEMANCIK M., RENAUDIN J., BOVÉ J.M. ET EVEILLARD S.

INRA-Université Bordeaux 2, 71 avenue Edouard Bourlaux, BP81 33883 VILLENAVE DORNON CEDEX, FRANCE

Le Huanglonbing (HLB, ex-greening) est une des plus graves maladies des agrumes. Elle est retrouvée en Asie, en Afrique du sud, dans la Péninsule Arabique ainsi que dans certaines îles de l'Océan Indien (Maurice, Réunion et Madagascar). L'agent responsable de la maladie est une bactérie de type gram négatif strictement restreinte au phloème des plantes infectées, transmise par insectes vecteurs. Cet organisme appartenant à la sous classe des alpha-protéobactéries est encore non cultivé, ce qui rend sa caractérisation difficile. Deux espèces ont été identifiées : « *Candidatus* » *Liberibacter africanus* responsable de la maladie en Afrique et « *Candidatus* » *Liberibacter asiaticus* responsable de la maladie en Asie. Treize anticorps monoclonaux dirigés contre onze isolats différents de cette bactérie ont permis une classification en sept sérogroupes, révélant la biodiversité de la bactérie. Cependant, ces anticorps monoclonaux sont trop spécifiques et ne sont pas appropriés pour le diagnostic et l'épidémiologie. Une approche PCR-RFLP basée sur le gène *omp* a été utilisée pour étudier la variabilité génétique des isolats de *Ca. L. asiaticus*. Les OMP forment une grande famille de protéines ayant de multiples fonctions (porine, adhésine, récepteur à bactériophages...) et souvent fortement immunogènes. Les séquences nucléotidiques de la région du gène *omp* de « *Candidatus* » *Liberibacter africanus* (isolat Nelspruit) et de « *Candidatus* » *Liberibacter asiaticus* (isolat Poona) ont été déterminées par PCR et par marche sur le chromosome. L'organisation des gènes est identique chez *Ca. L. africanus* et *Ca. L. asiaticus*, et similaire à celle d'autres bactéries à gram négatif. Le polypeptide codé par le gène *omp* de *Ca. Liberibacter* possède 38% d'identité et 60% de similarité avec une « outer membrane protein » de *Sinorhizobium meliloti* et *Omp1 d'Agrobacterium tumefaciens*. L'arbre phylogénique basé sur les séquences des gènes *omp* est en accord avec celui basé sur les séquences de l'ADNr 16S montrant que les isolats de *Ca. Liberibacter* se répartissent en deux groupes correspondant aux deux espèces. La distinction taxonomique des isolats de *Ca. L. asiaticus* a été effectuée par PCR-RFLP. En utilisant 5 enzymes différentes, chacun des 10 isolats testés a été associé avec une combinaison spécifique de profils de restriction. En permettant une identification rapide des isolats, cette PCR-RFLP constitue un nouvel outil non seulement pour le diagnostic (tous les isolats sont détectés) mais également pour les études épidémiologiques puisqu'il permet d'identifier chacun des isolats.

P-73 L'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE AU SEIN DE L'ESPÈCE XANTHOMONAS CAMPESTRIS RÉVÈLE UNE GRANDE HOMOGENÉITÉ ENTRE LES DIFFÉRENTS PATHOVARS

FARGIER EMILIE ET MANCEAU CHARLES

INRA, 42 rue George Morel 49071 BEAUCOUZÉ, FRANCE

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*), responsable de la nervation noire des crucifères, est la bactériose la plus destructrice des crucifères dans le monde. *Xcc* est aussi transmise par les semences. Récemment le genre *Xanthomonas* a été reclassé à l'aide d'hybridation ADN-ADN, et l'espèce *X. campestris* a été restreinte à six pathovars définis en fonction du type de symptômes provoqués et de la plante hôte d'isolement. Des études complémentaires ont aussi séparé l'espèce *X. campestris* en six races provoquant des réactions différentes sur certaines variétés de crucifères. L'objectif de ces travaux est d'étudier la diversité génétique intra-spécifique au sein de l'espèce *X. campestris*. Pour cela, une séquence interne de 550 pb dans sept gènes de ménage, (*atpD*= ATP synthase sous unité β , *dnaK* = Hsp 70, *efp*= elongation factor P, *glnA* = glutamine synthetase, *gyrB* = gyrase sous unité β , *rpoD* = facteur sigma 70, *fyuA* = protéine transmembranaire) a été déterminée chez une quarantaine de souches des différents pathovars de l'espèce *X. campestris* et de plusieurs autres espèces du genre *Xanthomonas*. L'analyse de ces séquences a pour but de distinguer les différentes souches de cette bactérie phytopathogène et d'établir une relation entre la diversité intra-spécifique et la localisation géographique par exemple ou le pouvoir pathogène (typage des pathovars). Toutes les souches de *X. campestris* forment un groupe identifié parmi les *Xanthomonas*. Des signatures génomiques ont été déterminées pour développer des réactifs moléculaires en vue de la détection et de l'identification rapide de *X. campestris*. A l'exception du pathovar *incanae* isolé de la giroflée, les autres pathovars (*aberrans*, *armoraciae*, *barbarae*, *campestris*, *raphani*) ne constituent pas des lignées génétiques identifiées. L'analyse du polymorphisme des séquences a permis de préciser le rôle relatif de la semence par rapport aux contaminations extérieures dans l'apparition de foyer de maladies dans les cultures. Les données de séquences de ces sept loci, répartis de façon régulière sur tout le génome de *X. campestris*, vont permettre une analyse de type MLST (Multi Locus Site Typing) pour compléter l'analyse génétique des populations de *X. campestris*.

P-74 GENETIC AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE* AND *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZICOLA* STRAINS FROM WEST AFRICA

CAROLINA GONZALEZ, BORIS SZUREK, HANNANE ENNAJDAOUI, MYRIAM CRISTINA DUQUE, SERE YACOUBA, VALÉRIE VERDIER

IRD-CNRS- Université de Perpignan, 52 avenue de Villeneuve 66860 PERPIGNAN, FRANCE

Bacterial leaf blight and bacterial leaf streak, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), respectively, were reported in the 80s in Africa. Recent surveys conducted in West Africa in 2003 showed that bacterial leaf blight is present in Mali, Niger and Burkina causing important rice yield losses. The local and improved varieties are highly susceptible to the disease. The use of varietal resistance is the most realistic and appropriate way to control the disease. Information on the pathogen's population structure is a prerequisite for guiding the selection and deployment of resistance gene in new environments. DNA fingerprinting using RFLP analyses, rep-PCR, identification of conserved effectors, as well as analysis of 16S rRNA gene sequence similarities were used to characterize 26 *Xanthomonas* species isolated from leaves of different African rice cultivars. *Xoo* and *Xoc* reference strains were also included. Pathogenicity of the strains was tested on a serie of nearly isogenic lines (NILs) carrying defined Xa resistance genes. Different rice cultivars (*O. sativa*, *O. glaberrima*) were also tested for their reaction to the *Xanthomonas* strains. Results obtained either by RFLP or PCR are consistent, and showed that African and Asian strains are genetically different. The 16S rDNA sequences of one *Xoo* Asian strain, two African *Xoo* and two *Xoc* strains were 100% identical and showed similarities to sequences of the others xanthomonads. Taken the data all together, cluster analysis showed that South American strains are closely related to Asian strains while the African strains form two clearly distinct groups. By conducting the pathogenicity assays on the NILS, we distinguished different groups among the African strains. One group consisting of Niger and Burkina strains was virulent on all the tested NILs. Two strains from Burkina induced moderate resistance reactions (MR) on Xa4, xa5, Xa7-containing lines. The other group, consisting of Malian strains, showed incompatible reactions on all the rice differential lines (IRBB and IR24). We reproduced the typical bacterial blight symptoms on a large set of different rice cultivars with all the isolated African strains except for 10 from Mali. These strains when leaf infiltrated, produced the typical bacterial leaf streak symptoms caused by *Xoc*. By a combination of DNA and pathotypic analysis we present here the first characterization of *Xoo* and *Xoc* in West Africa. Our results also showed the substantial differences between the African and Asian *Xoo* genomes.

P-75 SPECIFIC DNA PROBES AND PRIMERS FOR THE SENSITIVE DETECTION OF XANTHOMONAS AXONOPODIS PV DIFFENBACHIAE AND THE STUDY OF ITS GENETIC DIVERSITY

H. M. KHOODOO, F. SAHIN* AND Y. JAUFEEERALLY-FAKIM

*University of Mauritius, Reduit, Mauritius and * Attaturk Univerity Erzurum, Turkey.*

yasmina@uom.ac.mu

Xanthomonas axonopodis pv *diffenbachiae* has caused significant economic losses to growers of anthurium in different parts of the world. Hawaii, in particular, had been badly hit by this disease in the 1990's. In Mauritius anthurium export is a major industry contributing to an important part of the GDP. Although the disease has not been reported here, it has reached the neighbouring island of Reunion. Recent evidence has shown that the pathogen can be spread through in vitro grown plantlets. A sensitive assay for *X. axonopodis* pv *diffenbachiae* is therefore essential for the monitoring of the disease. In this study, RAPD profiles were used to compare virulent and non-virulent strains of *X.a.* pv *diffenbachiae* and specific DNA probes were obtained from the amplified fragments. Both the RAPD and the Southern analyses indicated the genetically diverse nature of the strains originating from several countries, including Hawaii, Brazil and Reunion amongst others. Eight primers were selected and they could differentiate the strains on the basis of serotype as well as host range. The strains used could be placed into four DNA groups. DNA probes were isolated which could hybridise specifically to strains from within the DNA groups.

Following the sequencing of the specific fragments, primers were obtained that amplified the strains from the various hosts with some primers specific for one host range and not the other. Combining the primer sets into a multiplex reaction was successful in amplifying all the strains. Immunocapture-PCR, using a genus-specific monoclonal antibody, with extracts made from infected leaf materials showed that the technique is sensitive enough to be used for detection of latent infections.

The tools developed in this study will be useful for both the specific detection of this pathogen as well as for assessing the relatedness of strains of different geographical origins. They demonstrated that although the disease is not present in Mauritius, isolates of *Xanthomonas* are present here but are not virulent

P-76 GÉNOTYPAGE DU SUGARCANE YELLOW LEAF VIRUS PRÉSENT EN GUADELOUPE ET À LA RÉUNION

ABU AHMAD Y.¹, ROYER M.¹, COSTET L.², DAUGROIS J.-H.³, LETT J.-M.² ET ROTT P.¹

IUMR 385 ENSAM-INRA-CIRAD, Biologie et Génétique des Interactions plante-parasite, Campus International de Baillarguet TA 41/K 34398 MONTPELLIER, France

2

3 CIRAD, Petit Bourg, Guadeloupe

Plusieurs études de diversité génétique ont récemment permis de suggérer l'existence de différentes souches au sein du Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV), agent causal de la feuille jaune de la canne à sucre. Dans le but d'identifier et de décrire plus précisément des souches du SCYLV, nous avons entrepris le séquençage du génome entier de huit isolats viraux originaires de différentes origines géographiques. Les six ORFs ont été clonés et séquencés entièrement pour cinq isolats (BRA-Y1 du Brésil, PER-Y1 du Pérou, REU-Y1, REU-Y2 et REU-Y3 de La Réunion) et partiellement pour trois autres (CHN-Y1 de Chine, COL-Y1 de Colombie et CUB-Y1 de Cuba). Quatre souches de SCYLV (BRA pour Brésil, CUB pour Cuba, PER pour Pérou et REU pour Réunion) ont été identifiées en se basant sur des analyses phylogénétiques réalisées avec les séquences représentant 70% du génome des huit isolats. Des amorces spécifiques permettant d'identifier rapidement par RT-PCR ces souches de SCYLV ont été dessinées. Elles permettent d'amplifier un fragment unique du génome de chaque souche mais ne permettent pas de différencier, à ce stade de notre étude, les souches BRA et PER qui sont assez proches. Ces amorces ont ensuite été utilisées pour caractériser les souches présentes dans deux aires de culture de la canne à sucre très éloignées, la Guadeloupe et La Réunion. Dix sept échantillons foliaires sur 32 originaires de La Réunion (variétés R490, R570 et R577 créées localement) étaient infectés uniquement par la souche REU et deux échantillons de la variété SP71-6163 importée du Brésil l'étaient uniquement par la souche BRA (ou PER). Une co-infection des souches REU et BRA (ou PER) a été mise en évidence dans 13 échantillons de la variété SP71-6163. Vingt échantillons sur 27 originaires de Guadeloupe étaient infectés uniquement par la souche REU (notamment les variétés R570 et SP71-6163) et quatre l'étaient uniquement par la souche BRA (ou PER). Deux échantillons (variété SP71-6163) étaient infectés uniquement par une troisième souche (CUB). Une co-infection de deux souches (CUB et REU) a été détectée dans un seul échantillon. Plusieurs souches de SCYLV peuvent donc coexister dans une même zone géographique voire dans une même plante. Si les souches virales BRA (ou PER) et REU existent toutes les deux à La Réunion, seule la souche REU a été détectée à ce jour dans les variétés créées localement. La souche BRA (ou PER), importée selon toute vraisemblance à partir du Brésil par l'intermédiaire de la variété SP71-6163 en 1987, ne s'est pas propagée sur l'île de La Réunion à ce jour, pour des raisons encore inconnues. Etant donné que la canne à sucre est le seul hôte naturel connu du SCYLV et que cette plante n'est pas native de la Guadeloupe, ni de La Réunion, le virus a très certainement été importé dans ces îles à partir d'une autre aire de culture contaminée. La présence de plusieurs souches du SCYLV suggère différentes introductions du virus et/ou une évolution du virus après son introduction dans un nouvel environnement.

P-77 MARIAGE CONSANGUIN DANS LA RÉGION DU GHARB-CHRARDA-BÉNI HSEN (MAROC)

HAMI HINDE, SOULAYMANI ABDELMAJID, MOKHTARI ABDELRHANI.

Université Ibn Tofaïl - Faculté des Sciences-Département de Biologie BP 133 14000 KÉNITRA, MAROC

La pratique de mariage consanguin est très répandue au Moyen-Orient, en Afrique du nord et au Sud-Ouest asiatique où 20 à plus de 50 % de mariages sont consanguins. Les mariages entre cousins germains sont le type le plus commun dans le monde, ils constituent presque le tiers de tous les mariages dans beaucoup de pays arabes et représentent le type le plus fréquent de mariage consanguin pour les Musulmans. Il est établi que le mariage consanguin présente un effet délétère quant à l'apparition de malformations congénitales et de maladies héréditaires rares. La présente étude a pour but de déterminer la fréquence des mariages consanguins et le coefficient moyen de consanguinité dans la région du Gharb-Chrarda-Béni Hssen au Maroc, de vérifier l'existence d'une certaine continuité dans la pratique de ce modèle de mariage d'une génération à l'autre (génération des couples étudiés et génération de leurs parents). L'étude tente également de déterminer les facteurs socio-démographiques influençant la répartition des unions consanguines dans cette région. L'analyse d'un échantillon de 106 couples formés entre 1977 et 2003 a été établie à partir de données tirées d'une étude prospective de cohorte conduite dans le service de Maternité et Gynécologie de l'Hôpital Cherif Idrissi à Kénitra (Maroc) entre juin 2003 et février 2004. Les résultats montrent que l'âge moyen des femmes interrogées est de 27.78 ± 6.23 ans. 19.81% des mariages sont consanguins (IC à 95% est de 12 à 27.62%) dont 47.62 % sont en faveur des cousins germains avec un coefficient moyen de consanguinité F de $7.5 \cdot 10^{-3}$. La génération des parents des couples étudiés représente un taux de consanguinité plus élevé (21.69%) avec un coefficient moyen de consanguinité F de $8.43 \cdot 10^{-3}$. Les mariages entre cousins germains qui représentent 60.98 % des unions consanguines restent une pratique sociale courante. Le niveau d'instruction bas, le lieu de résidence, et la profession de l'homme- sachant que le taux d'activité des femmes est très faible (96.2 % de femmes sont au foyer)- sont les principaux facteurs socio-démographiques influençant la fréquence de la consanguinité dans cette région.

Session E

De la paillasse au champ et du champ à la paillasse

P-78 L'AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE DU CHAMPIGNON DE PARIS POUR LA RÉSISTANCE AUX MALADIES : APPORT DES OUTILS MOLÉCULAIRES.

M. FOULONGNE, C. SPATARO, C. DESMERGER, A. RODIER, P. CALLAC, J.M. SAVOIE, J.M. OLIVIER

INRA, Domaine de la Grande Ferrade 33883 VILLENAVE DORNON, FRANCE

Le champignon de Paris ou champignon de couche, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, est le champignon comestible le plus cultivé dans le monde. Face à un marché concurrentiel, la filière a su développer depuis une dizaine d'année, un solide potentiel en terme de productivité et de qualité, par d'importants efforts de modernisation des modes de production. Dans ce contexte, l'amélioration génétique, en particulier pour la résistance aux maladies de la culture, est un atout essentiel pour répondre aux exigences du marché actuel, en terme de qualité et de productivité. Le champignon de Paris s'avère un modèle d'étude particulièrement original. Les méthodes utilisées pour l'amélioration des plantes constituent une base de travail pour l'élaboration de stratégies de sélection adaptées au matériel fongique. Dans cette optique, l'utilisation des biotechnologies appliquées à *A. bisporus* est incontournable. Plusieurs thématiques scientifiques s'appuyant sur les outils moléculaires, s'articulent autour de l'amélioration du champignon de Paris pour la résistance aux pathogènes. 1) Ressources génétiques et exploitation de la diversité. La collection disponible à ce jour est constituée d'environ 550 souches cultivées et sauvages, provenant d'origines géographiques variées. La diversité génétique a été démontrée à l'aide de marqueurs moléculaires. L'exploitation de ces ressources devrait permettre d'élargir la base génétique très restreinte des cultivars actuels. Un screening phénotypique de la collection pour la recherche de sources de résistance est en cours. 2) Compréhension du déterminisme génétique des résistances. Le développement d'une carte génétique a été initiée et a permis de positionner sur le génome des loci d'intérêts tels que la couleur du chapeau (brun vs. blanc). Une stratégie de sélection assistée par marqueur a été développée et validée pour ce caractère. Actuellement, le processus de cartographie se poursuit à travers le développement de nouveaux outils tels que les marqueurs microsatellites. Une première recherche de QTL impliqués dans la résistance à la tache bactérienne causée par *Pseudomonas tolaasii* a permis de mettre en évidence un QTL à proximité du locus couleur, expliquant 40 % de la variation phénotypique. Une approche similaire est en cours pour la résistance à *Verticillium fungicola*. 3) Biologie de l'interaction champignon-bioagresseurs. Afin d'étudier à l'échelle moléculaire l'interaction hôte-pathogène, une étude d'expression de certains gènes candidats impliqués dans les processus oxydatifs (laccase, tyrosinase) a été initiée. Des marqueurs de la résistance pourront être proposés pour aider à la sélection. Les outils moléculaires contribuent ainsi à une meilleure connaissance de notre modèle d'étude et représentent un appui potentiel pour le travail de sélection.

P-79 ABOUTISSEMENT DE LA SÉLECTION D'UN PLATANE RÉSISTANT AU CHANCRE COLORÉ

VIGOUROUX.A., OLIVIER R.

Place de la Poste 4 30131 PUJAUT, F

Comme rapporté antérieurement, la sélection d'un platane résistant à la grave maladie du chancre coloré a été entreprise depuis 1989. Des croisements ont été effectués entre quelques clones de platanes américains, *Platanus occidentalis* L. , naturellement résistants mais non acclimatés en Europe, et le platane du Moyen Orient *P. orientalis* L. De tels croisements fournissent des hybrides a priori rustiques puisqu'homologues de notre platane commun (*P. acerifolia* ou *hispanica*) certains devant en outre hériter de la résistance du parent américain. Pendant le délai d'obtention de nombreuses graines et plants, un test d'inoculation du parasite (le champignon *Ceratocystis fimbriata platani*) a été mis au point, d'ailleurs laborieusement compte tenu de la virulence et du mode de développement complexe du parasite. Appliqué sur un premier lot de 960 plants d'âge et de diamètre adéquats (2 ans révolus et 20 mm) il ne laissa subsister que 110 survivants au bout d'un an. Réinoculés, ceux-ci furent ramenés à 22 à la fin de la 2e année. Pour davantage assurer la sélection et aussi pouvoir classer ces individus tous différents, on les a rabattus à environ 1m du sol pour leur faire émettre un bouquet de rejets et 12 de ceux-ci reçurent à leur tour une inoculation. Ils étaient à ce moment là âgés de seulement 18 mois, et non 2 ans comme les axes testés précédemment, pour accroître la pression de sélection. Deux racines par arbre, susceptibles de réagir différemment des tiges, ont aussi été testées. Suivis pendant 2 ans, de nombreux rejets se desséchèrent sur la plupart des arbres. Seuls, les n°7, 20, et 21 conservèrent leurs 12 rejets en bonne santé mais seul le n° 7 contient aussi l'infection au niveau de ses racines. La recherche du parasite par une méthode fine de détection du pathogène permit de constater que celui-ci avait été complètement éliminé de 23 échantillons sur 24, (le positif étant le résultat d'une tentative anticipée de 7 mois), ce qui prouvait un niveau de résistance assez remarquable. La commercialisation du clone correspondant sous le nom de Vallis clausa a été décidée et les tout premiers plants ont été mis sur le marché cet hiver 2004-2005. La sélection se poursuit pour disposer de ressources génétiques diversifiées

P-80 MÉTHODE D'ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DES STIMULATIONS DES DÉFENSES DE LA VIGNE CONTRE L'OÏDIUM (*ERYSIPHE NECATOR*) ET LE MILDIU (*PLASMOPARA VITICOLA*)

JÉRÔME BOUSCAUT, CHLOÉ MARCHIVE, CASSANDRINE SOULARD, ET MARIE-FRANCE CORIO-COSTET

INRA-Bordeaux, BP 81 33883 VILLENAVE DORNON, FRANCE

Devant les problèmes récurrents de résistance aux fongicides, des méthodes alternatives sont actuellement recherchées faisant appel à la stimulation des défenses des plantes. Si de nombreuses recherches cognitives sont en cours sur le sujet, peu de méthodes permettent d'évaluer l'efficacité des stimulations dans des conditions proches de celles du vignoble et de manière comparative. C'est pourquoi nous avons développé une méthode permettant d'évaluer l'efficacité de différents stimuli sur deux parasites obligatoires (l'oidium et le mildiou) à trois niveaux: - un niveau biologique, qui évalue le développement des pathogènes, en fonction du temps d'application du stimulateur - un niveau biochimique, où nous quantifions et qualifions les polyphénols (trans-resvératrol, piceïdes etc..) - et un niveau moléculaire, qui évalue l'expression de gènes potentiels d'intérêt (facteurs de transcription, gènes impliqués dans des voies de métabolites secondaires. Pour valider cette étude, nous avons utilisé comme molécule de référence le S-méthyl-benzolar, un benzothiadiazole connu pour stimuler les défenses de plantes. Les tests biologiques développés sur feuilles ou plantes par pulvérisation permettent d'évaluer l'efficacité d'une stimulation soit quelques jours avant ou après une contamination par les deux pathogènes, soit extemporanément. Les inoculums ont été recalibrés, et les dosages biochimiques et moléculaires sont réalisés de 7 à 12 jours après inoculation. L'application de cette méthode d'évaluation de l'efficacité sur le benzothiadiazole et différentes molécules susceptibles de stimuler les défenses de vigne (fosétyl-aluminium, fertilisant, acide salicylique, acide-aminobutyrique...), révèle qu'il est possible de classer les molécules et leur efficacité en les testant simultanément pour deux pathogènes. De plus les résultats obtenus apportent des données inédites sur le comportement des deux parasites obligatoires à différents stimuli des défenses de la vigne. Cette étude a permis de définir une méthodologie fiable, pour l'étude de molécules potentiellement élicitrices et par une évaluation comparée, une hiérarchisation des différentes molécules testées.

P-81 RÉACTIONS DE DÉFENSE INDUITES PAR IODUS 40[®], MILSANA[®], LE SALICYLYL HEPTANOATE ET LE TRÉHALOSE LORS D'UNE INTERACTION BLÉ/*BLUMERIA GRAMINIS* F.SP. TRITICI DE TYPE COMPATIBLE

DELPHINE RENARD ¹, BÉATRICE RANDOUX ^{1,2}, PHILIPPE REIGNAULT ¹, JEAN SANSSÉNÉ ² ET ROGER DURAND ¹

1 Université du Littoral Côte d'Opale, 17 avenue Louis Blériot B.P. 699 62228 CALAIS CEDEX, FRANCE

2 ISAB, rue Pierre Waguet, BP 30313 60026 BEAUVAIS CEDEX, FRANCE

L'œidium constitue l'une des maladies les plus dommageables sur le blé. Il est responsable de pertes de rendement à travers le monde, ce qui amène à l'usage intensif de fongicides de synthèse. Cette stratégie de lutte pose des problèmes d'ordres environnementaux et de gestion de l'apparition des résistances aux fongicides utilisés. Des moyens de lutte alternatifs doivent donc être considérés. Notre travail présente des réactions de défense activées lors d'une interaction compatible lorsque qu'une gamme de produits naturels ou de molécules élicitrices (Iodus 40[®], Milsana[®], salicylyl heptanoate (SH), tréhalose [1]) est appliquée sur la plante. Nous avons étudié principalement le niveau de protection obtenu, le métabolisme des formes activées de l'oxygène (FAOs), la peroxydation des lipides et l'accumulation de composés phénoliques. Les plantes sur lesquelles les différents traitements ont été appliqués montrent des différences quantitatives dans le niveau de protection obtenu. Puisque les réactions de défense impliquent l'accumulation de FAOs, ces marqueurs précoces de l'élicitation ont été analysés au niveau histochimique, notamment l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) au site de pénétration par le tube germinatif appressorial (TGA) [2]. Iodus 40[®], Milsana[®], le SH and le tréhalose induisent une plus forte fréquence de coloration par le DAB avec une forte intensité. De plus, le SH induit une plus forte fréquence de nécrose cellulaire totale au point de pénétration et Milsana[®] montre un effet direct sur la germination des conidies avec un TGA anormalement long. Enfin, dans la mesure où la peroxydation des lipides est attendue comme une conséquence principale de l'accumulation de FAOs, le taux de lipides peroxydés a aussi été évalué. La gamme des réactions de défense activées par les quatre éliciteurs ou molécules testées dans cette étude sera discutée.

- [1] Reignault, Ph., Cogan, A., Muchembled, J., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Durand, R. and Sancholle, M. (2001). Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist* 149: 519-529.
[2] Trujillo, M., Kogel, K.H. and Huckelhoven, R. (2004). Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the non-host interactions of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17: 304-312.

P-82 MÉTABOLISME DES FORMES ACTIVÉES DE L'OXYGÈNE INDUIT PAR DES EXTRAITS PECTIQUES DE LIN, LE CHITOSAN ET MILSANA® LORS D'UNE INTERACTION COMPATIBLE BLÉ/*BLUMERIA GRAMINIS* F. SP. *TRITICI*

BÉATRICE RANDOUX ^{1,2}, PHILIPPE REIGNAULT ¹, JEAN SANSSÉNÉ ² ET ROGER DURAND¹

1 Université du Littoral Côte d'Opale, 17 avenue Louis Blériot B.P. 699 62228 CALAIS CEDEX, FRANCE

2 ISAB, rue Pierre Waguet, BP 30313 60026 BEAUVAIS CEDEX, FRANCE

La vague oxydative consécutive à l'attaque d'une plante par un agent pathogène constitue un véritable carrefour de différentes voies aboutissant à l'induction des réactions de défense du végétal. Parmi les formes activées de l'oxygène produites, le peroxyde d'hydrogène est connu pour son effet antifongique direct, mais aussi pour son implication dans les mécanismes de renforcement de la paroi des cellules végétales et pour son rôle de messenger dans les processus débouchant sur l'expression des gènes de défense chez la plante. Ainsi, dans le but d'évaluer le potentiel éliciteur de différents produits naturels ou molécules chez un cultivar de blé sensible à l'oïdium, nous avons recherché des modifications dans la synthèse, l'accumulation et l'utilisation du peroxyde d'hydrogène dans des feuilles traitées. Les activités peroxydase et catalase, utilisant le peroxyde d'hydrogène comme substrat, et les activités oxalate oxydase et superoxyde dismutase, qui libèrent du peroxyde d'hydrogène, ont été mesurées après traitement. Alors que l'activité catalase ne s'avère pas un bon marqueur de l'élicitation testée dans notre étude, l'activité peroxydase augmente de façon significative mais non systémique dans des fragments foliaires traités par des homogalacturonanes (HGAs) de lin non acétylés et le chitosan. Par contre, seuls les HGAs sont à l'origine d'une augmentation de l'activité de l'oxalate oxydase. Les molécules testées interviennent donc de façons différentes sur le métabolisme des formes activées de l'oxygène. La gamme des réactions de défense que nous testons actuellement en complément de cette étude, notamment en contexte infectieux, sera présentée.

P-83 APPLICATION OF PLANT PRODUCTS TO CONTROL OF SOME SOILBORN FUNGAL PATHOGENS

GHORBANY, M. SALARY , M

Université de Zabol, Departement de Plant protection 89186 ZABOL, IRAN

More than 15 plant species were tested for their antifungal effect on radial growth and spore germination of *Fusarium oxysporum f.sp cumini* causing cumin wilt and *Fusarium equisetii* causing dry rot of potato tubers and *Rhizoctonia solani* causing sugare beet root rot. In this experiment cold water extracts and methanol extracts of various plants were prepared and their efficacy was tested against pathogens by using of filter paper method, poisoned food technique and steams of extracts. Influence of plant extracts on cumin wilt disease and dry rot of potato tubers evaluated by invivo tests. Seed extracts of *Trachyspermum copticum*, leaf extracts of *Lavandula angustifolia* and flower extracts of *Rheum ribes* effectively inhibited the radial growth and spore germination of these fungi by using of filter paper and poisoned food methods. Steams of extracts in *T. copticum* and *Mentha pulegium* effectively inhibited the radial growth of fungi. The invivo tests indicated that these three extracts reduce disease incidence of cumin wilt disease and dry rot of potato tubers.)

P-84 EVOLUTION OF FUNGICIDE RESISTANCE IN GRAPEVINE DOWNY MILDEW POPULATIONS

W-J. CHEN, F. DELMOTTE, S. RICHARD-CEVERA, L. DOUENCE, R. CAROLI, S. MENAOULI, M-F. CORIO-COSTET

Domaine de la Grande Ferrade, BP81 - UMR SV (INRA-ENITAB) 33883 VILLENAVE DORNON, FRANCE

The causal agent of grapevine downy mildew disease, *Plasmopara viticola* (Oomycetes), has been accidentally introduced into France in 1878 from North America. Soon after its introduction, the disease spread rapidly through most of continental Europe, becoming a serious threat for European viticulture. To date, no effective disease control strategy has been applied except systematical fungicide treatments, which results not only in negative effects on the environment, but also in rapid adaptation to fungicides of this pathogen. The main goal of this research is to understand the evolutionary mechanisms of fungicide resistance such as pathogen dispersal ability and the consequences of reproduction modes in resistance adaptation, expecting to open new perspectives on disease control. We currently developed 3 microsatellites loci (3 others are in progress) to assess baseline information of population genetic structure of grapevine downy mildew in French vineyards. We also characterized and quantified the resistance alleles of cytochrome b, QoI fungicide-targeted gene, by implementing in vivo assay of sensitivity to QoI fungicide on living isolates and the screening technique of SSCP and CAPs on field populations in order to assess the frequency of resistance alleles, ultimately to understand the evolutionary mechanisms of fungicide resistance. Three significant results have been shown: (1) French vineyards have been rapidly invaded by QoI resistance alleles (homologation of QoI fungicides in 1996!); (2) significant sexual reproduction repeatedly occurred in downy mildew populations which benefits perhaps quick emergence of resistance genotypes, while asexual reproduction (in a few particular populations) helps to “amplify” resistance genotypes within populations; (3) resistance alleles can spread through gene flow.

P-85 ETUDE DE LA COLONISATION RHIZOSPHERIQUE PAR L'AGENT ANTAGONISTE *PYTHIUM OLIGANDRUM* EN CULTURE HORS-SOL DE TOMATE PAR UNE TECHNIQUE DE PUCES À ADN

G. LE FLOCH¹, C. A. LÉVESQUE², G. BARBIER¹, Y. TIRILLY¹ ET P. REY¹

1 Biodiversité et Ecologie Microbienne, Université de Bretagne Occidentale, ESMISAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280, Plouzané, France.

2 CRECO, Agriculture et AgroAlimentaire Canada, KW Neatby Building, 960 Carling Avenue, K1A0C6, Ottawa,

En culture hors-sol, l'utilisation de l'agent antagoniste *P. oligandrum* a montré un réel potentiel dans la lutte contre les infections racinaires causées par des agents pathogènes fongiques. L'efficacité *P. oligandrum* dépend essentiellement de son adaptation et de sa survie dans la rhizosphère. L'optimisation de cette lutte biologique requiert une sélection efficace des souches du champignon mais également des méthodes de détection adaptées. Sur la base des connaissances acquises avec une souche de référence, une co-inoculation de souches sélectionnées de *P. oligandrum* a été réalisée en serre expérimentale. Trois critères de sélection ont été définis : (i) la production de tryptamine, une auxine produite par plusieurs *Pythium spp.* dont la synthèse par *P. oligandrum* a été corrélée à un développement accru du système racinaire ; (ii) la production d'oligandrine, une protéine (de la famille des pythines) capable d'induire une protection contre différents pathogènes et (iii) la production d'oospores qui sont les organes de reproduction mais aussi de survie du champignon dans des conditions environnementales défavorables. Le suivi de la colonisation racinaire par *P. oligandrum* pendant une saison culturale a été réalisé par amplification de la région ITS de l'ADN ribosomique par PCR et hybridation à des "macroarrays" (technique de Reverse Dot Blot Hybridization ou RDBH). La RDBH permet de détecter *P. oligandrum* tout au long de la durée de l'expérimentation (6 mois) alors que par dépôts racinaires sur milieu sélectif, *P. oligandrum* n'est retrouvé que les 3 premiers mois. Cette différence est à relier au fait que ces 2 techniques le détectent sous différents états physiologiques. Le milieu sélectif est performant pour mettre en évidence l'oomycète sous forme de mycelium et de zoospores mais ne permettra pas ou peu la détection d'oospores, forme de dormance à faible pouvoir germinatif. Pour des raisons indéterminées, *P. oligandrum* se présenterait essentiellement sous forme d'oospores dans la seconde période de cultures. Cette hypothèse traduirait une originalité de la dynamique d'installation de *P. oligandrum*. Dans ces conditions, l'amplification « non sélective » par PCR d'une région de l'ADN de *P. oligandrum* rend possible sa détection par RDBH. quelque soit son état physiologique La RDBH utilisant des jeux ordonnés d'oligonucléotides, de nombreuses espèces de *Pythium* peuvent être détectées (environ 100) à partir d'un même échantillon de racines. Durant la saison culturale, seulement quatre autres espèces sont détectées: *P. intermedium*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* et *P. violae*. Le principal apport de cet outil moléculaire est donc, d'une part une meilleure identification des différentes espèces colonisant la rhizosphère en culture hors-sol et d'autre part un seuil de détection très nettement abaissé.

P-86 EFFET DE L'HUMIDITÉ ET DE LA COMPACTITÉ DU SOL SUR LA POURRITURE DU POIS CAUSÉE PAR *APHANOMYCES EUTEICHES* ET SUR LE DÉPLACEMENT DE SES ZOOSPORES

JEAN SANSSÉNÉ, STÉPHANE CHAUPLANNAZ, MARTIN NAVARRO, CATHERINE ABJEAN, HUBERT BOIZARD, GUY RICHARD

ISAB, rue Pierre Waguet, BP 30313 60026 BEAUVAIS CEDEX, FRANCE

Aphanomyces euteiches produit chez le pois une grave pourriture des racines. Le parasite se dissémine par des zoospores capables de nager ou d'être entraînées dans la phase liquide du sol. Les symptômes de la maladie sont les plus marqués dans les sols très humides, soit à l'issue de fortes pluies, soit en raison d'un mauvais drainage. Le tassement du sol, en réduisant le drainage, et par conséquent en conservant une humidité du sol élevée après les pluies, est souvent considéré comme un facteur aggravant de la maladie. Toutefois le tassement limite la mobilité des zoospores, en réduisant la porosité du sol et la taille des pores dans lesquelles elles se déplacent. Face à cette apparente contradiction, il est nécessaire de comprendre l'effet du tassement sur le développement de la maladie causée par *Aphanomyces euteiches* afin d'identifier les conditions de sol et les techniques culturales favorisant ou non la maladie. Nous avons dans un premier temps étudié au laboratoire (i) l'effet croisé du tassement et de l'humidité du sol sur le développement de la maladie, puis (ii) l'effet de la taille des pores du sol sur la mobilité des zoospores. Ensuite, en nous rapprochant des conditions de champ, nous avons comparé l'effet sur la dissémination de la maladie de trois structures de sol reconstituées en grands bacs (iii). (i) En sol très sec, l'expression des symptômes est très faible voire nulle. Elle s'accroît fortement avec l'humidité du sol, mais inversement diminue avec la densité apparente du sol. Ces résultats confirment l'effet favorable de l'humidité du sol et l'effet direct défavorable du tassement. (ii) Les zoospores sont arrêtées par un filtre de sol limono-argileux d'un demi centimètre d'épaisseur de masse volumique de 1.6 Mg.m³ (dont la taille des pores est inférieure à 10µm). Comparativement, elles traversent un filtre de masse volumique de 1.4 Mg.m³, qui correspond à une masse volumique fréquente en sol cultivé et traversent encore plus facilement un filtre de masse volumique de 1.2 Mg.m³ qui correspond à un sol très poreux. Nous observons parallèlement que les zoospores sont mobiles lorsque le diamètre de pores remplis d'eau est supérieur à 10 µm, dimension voisine de leur taille, et que leur mobilité augmente avec la taille des pores entre 10 et 50 µm. (iii) Les résultats obtenus en sols reconstitués en grands bacs confirment qu'une semelle compacte empêche le passage du parasite. Mais en limitant le drainage, elle favorise l'accumulation d'eau à sa surface et ainsi la dissémination latérale du parasite. Des blocs compacts peuvent ponctuellement jouer un rôle similaire en dirigeant le flux d'eau latéralement. Finalement, même si le tassement du sol limite localement le déplacement des zoospores, il favorise leur dissémination latérale de part la modification des flux d'eau qu'il entraîne.

Nous remercions le Conseil régional de Picardie et le Ministère de l'Agriculture pour leur soutien financier, ainsi que Bernard Tivoli et Anne Moussard de l'INRA de Rennes pour leurs conseils.

P-87 LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA « BRULURE DU LIN » A L'AIDE DE *GLOMUS INTRARADICES* ET DE *TRICHODERMA ATROVIRIDE*

S. BONNAN, M. BROCHARD ET E. CARIOU-PHAM

Antenne ITL au CETIOM -Centre de Grignon- BP04 78850 THIVERVAL GRIGNON, FRANCE

La brûlure du lin (*Linum usitatissimum*) est une maladie d'origine tellurique qui affecte essentiellement les zones maritimes de production de lin fibre. Afin d'élaborer une méthode alternative de lutte, nous avons évalué la réponse de quelques variétés de lin fibre (sensibles et tolérantes) à un enrobage de semence (semences biotizées, fournies par la société AGRAUXINE) avec un champignon mycorhizien arbusculaire (*Glomus intraradices*) ou un antagoniste (*Trichoderma atroviride*, souche de la société AGRAUXINE). Les essais sont menés en présence de brûlure, due au complexe parasitaire majoritairement présent sur les sols Français, qui associe *C. elegans* à d'autres espèces de *Pythium*. Pour cela des plantes sont cultivées en plein champ sur une terre naturellement contaminée par la maladie et en serre avec une inoculation artificielle à l'aide de deux agents pathogènes, *C. elegans* et *P. sylvaticum*. Nous avons pu mettre en évidence un effet positif des semences biotizées sur la croissance et la vigueur des plantes mais une efficacité faible sur les symptômes racinaires. La capacité des semences biotizées à rendre les plantes plus tolérantes à la brûlure a été observée de façon transitoire.

P-88 ETUDE DE LA VIRULENCE DE *PYRENOPHORA TERES* SUR L'ORGE

NAIMA AIT DAOUD¹, AHMED ALLAMI¹, FATIHA BENTATA², DOHA BENALI¹, ABDELMAJID SOULAYMANI¹, ABDELAGHANI MOKHTARI¹, FATIMA GABOUN²

1 Institut Nationale de Recherche Agronomique à Rabat, Laboratoires de Phytopathologie et de Biotechnologies, Guich

2 Laboratoire de Pharmacologie et toxicologie Faculté des Sciences Université IBN TOFAIL Kenitra. 14000 KENITRA, MAROC

La présente étude a été entamée pour contribuer à la connaissance de la variation pathogénique chez *Pyrenophora teres*. Au Maroc cette étude a été réalisée à l'Institut Nationale de Recherche Agronomique à Rabat (Laboratoires de Phytopathologie et de Biotechnologies, Guich), en collaboration avec le laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté des Sciences de Kenitra et entre dans le cadre du projet de Protars (N°P5T1/ 05). 38 isolats de *Pyrenophora teres* ont été utilisés pour l'inoculation de 5 variétés d'orge, les observations ont portées sur la notation de la sévérité de la maladie à l'aide de l'échelle de Tekauz (1985), le type de symptôme ainsi que le % de surface foliaire attaquée par chaque isolat vis à vis des 5 variétés d'orge. Parmi les 38 isolats testés, les isolats 27 et 29 originaire du Nord et de Doukkala se sont révélés virulents vis à vis des 5 variétés. Alors que la variété Tamellalet a montré plus de résistance vis à vis du champignon *Pyrenophora teres* f.sp *teres*, que les autres variétés utilisées comme gamme différentielle. L'analyse effectuée par le cluster analysis a permis de regrouper les variétés selon leurs réactions vis à vis des 38 isolats. Ceci a permis de regrouper les 38 isolats en 12 groupes différents.

P-89 EFFET D'UNE INOCULATION DE BACTERIES ANTAGONISTES SUR LA STRUCTURATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES COLONISANT LES BIOFILTRIS UTILISES EN CULTURE HORS-SOL

RENAULT D.¹, DÉNIEL F.¹, BENIZRI E.², TIRILLY Y.¹, BARBIER G.¹ ET REY P.¹

(1) *Laboratoire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB, Université de Bretagne Occidentale-Brest, 29280 Plouzané.*

(2) *UMR INPL-ENSAIA-INRA Agronomie et Environnement, 2 avenue de la forêt de Haye, BP 172, 54500 Vandoeuvre les Nancy*

. En culture hors-sol, la biofiltration est utilisée pour lutter contre les risques phytopathologiques liés au recyclage des solutions nutritives. L'efficacité biocide des biofiltres résulte en partie de la colonisation bactérienne des substrats de filtration, ici, des grains de pouzzolane. Pour optimiser l'efficacité de ces systèmes, notre groupe cherche à renforcer cette composante biologique en réalisant des inoculations bactériennes avant la mise en fonctionnement des biofiltres. Comparativement à un filtre témoin (Tem), les colonnes filtrantesensemencées soit en *Pseudomonas putida* (Pp) ou en *Bacillus cereus* (Bc) ont une efficacité fongicide fortement accrue lors du démarrage du recyclage : le taux d'élimination des *Pythium* spp. passe de 56% (Tem) à 82% (Pp) et 100% (Bc). Un relarguage bactérien est enregistré lors du premier mois de fonctionnement des filtres inoculés. Néanmoins, sur le reste de la saison culturale, les filtresensemencés ont une efficacité bactéricide à la fois supérieure et plus stable que celle du filtre témoin (91±5% contre 68±16%). Durant la saison culturale, la communauté bactérienne totale cultivable colonisant les grains de pouzzolane des filtresensemencés est toujours plus abondante que celle du témoin. Cette différence est fortement marquée en début d'expérimentation (5 à 20.106cfu/g au lieu de 2.105cfu/g) et demeure significative après 6 mois de fonctionnement. Les densités des populations de *Pseudomonas* spp. et de *Bacillus* spp. dans chacun des 3 filtres montre que les *Pseudomonas* ont une meilleure aptitude à la colonisation que les *Bacillus*. En fin de saison culturale, l'analyse des communautés bactériennes colonisant l'ensemble des colonnes filtrantes a été réalisée. La flore bactérienne totale cultivable, les populations de *Pseudomonas* spp. et de *Bacillus* spp. sont plus abondantes dans la partie supérieure des biofiltres. Ce gradient de densité bactérienne est accentué pour les filtresensemencés. La caractérisation des profils métaboliques réalisée à l'aide de plaques Biolog GN2 montre que les aptitudes cataboliques des communautés bactériennes sont systématiquement différentes en haut des colonnes filtrantes par rapport aux étages intermédiaires et inférieurs au niveau desquels les communautés ne montrent pas de différences significatives entre elles d'un point de vue trophique. De plus, ces profils cataboliques au niveau des différents étages du biofiltre sont significativement modifiés lorsqu'une inoculation bactérienne est réalisée. Nos résultats soulignent enfin l'importance du choix de l'inoculum sur ce métabolisme, comme l'attestent les différences entre les deux biofiltres inoculés en bactéries. L'inoculation bactérienne présente donc un intérêt pour optimiser la biofiltration. Elle influence d'une part la densité des communautés bactériennes globales et d'autre part leur structure phénotypique. Le choix du type d'inoculum est un facteur à optimiser car il est déterminant sur la structuration bactérienne et l'efficacité biocide des biofiltres.

P-90 PROTECTION INTEGREE CONTRE LA POURRITURE GRISE DE LA VIGNE BASEE SUR LA SIMULATION DU RISQUE EPIDEMIQUE

M. FERMAUD¹, J. ROUDET¹, G. FROIDEFOND¹, P. PIERI²

1 UMR Santé Végétale INRA-ENITAB (fermaud@bordeaux.inra.fr) ;

2 UMR INRA Oenologie-Ampélogie, INRA, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon, France

. La Pourriture grise de la Vigne, due à *Botrytis cinerea*, se développe souvent de façon exponentielle sur les grappes en maturation (post-véraison). La sous population « transposa » est associée de façon quasi-exclusive à cette dynamique épidémique (Martinez et al., 2003). Il peut en résulter d'importantes pertes de récolte et un grave préjudice à la qualité des vins produits. Dans un contexte de Protection intégrée et afin d'optimiser l'usage des fongicides spécifiques, des indices climatiques prévisionnels du risque épidémique ont été développés. Ils dérivent d'analyses statistiques pluri-factorielles (principe de « Window Pane ») permettant de corréliser la progression des symptômes de la véraison à la récolte avec différentes variables climatiques standards enregistrées de juillet à septembre. Les données analysées ont été acquises de 1993 à 2001 sur deux sites de référence (Médoc et Graves) pour 3 cépages (Merlot noir, Cabernet sauvignon et Cabernet franc) en absence de traitement fongicide spécifique. Les deux variables expliquées sont l'évolution hebdomadaire de la fréquence de grappes attaquées (%) et l'évolution hebdomadaire de la sévérité au sein des grappes touchées (% de baies atteintes). Les données climatiques journalières ont donné lieu au calcul de variables intégratives (moyennes, cumul...). Ainsi, 6 variables thermiques, une de rayonnement, 3 variables hygrométriques et 3 variables pluviométriques ont été testées. Après identification des principales variables climatiques actives, deux indices climatiques ont été élaborés dont le calcul estime le taux hebdomadaire d'évolution des symptômes. Spécifiques du cépage, le premier correspond aux données en fréquence et le second à la sévérité. Dans le vignoble bordelais, une approche en réseau est mise en œuvre afin de valider ces indices de risque. Ainsi, en 2003 (5 sites) et en 2004 (9 sites, cv. Merlot), les courbes simulées d'évolution épidémique sont confrontées avec les cinétiques observées au vignoble. D'autres facteurs aggravants de la Pourriture grise sont intégrés, tels la maturité des baies ou la compacité des grappes. Des expérimentations sont également conduites afin d'optimiser la protection fongicide en fin de saison dès la véraison. En ayant recours à deux alertes successives selon le niveau des indices de risque, une règle de décision est proposée qui vise à ajuster la date du traitement fongicide préventif lorsque la cinétique épidémique est sur le point de s'enclencher. Les perspectives de développement d'outils d'aide à la décision sont discutées afin 1/ de réduire au strict minimum l'usage des fongicides anti-*Botrytis* à partir de la véraison, et 2/ d'optimiser la date des vendanges parce qu'elles sont souvent prématurées de peur d'un développement explosif de la Pourriture grise.

Martinez et al. 2003. Phenotypic differences between vacuola and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. Europ. J. Plant Pathol. 109 : 479-488.

