



**HAL**  
open science

**REPONSES ADAPTATIVES D'ALTERNARIA  
BRASSICICOLA AU STRESS OXYDATIF LORS DE  
L'INTERACTION AVEC LES BRASSICACEES. Rôle  
du métabolisme du mannitol et des  
Glutathion-S-transférases**

Benoit Calmes

► **To cite this version:**

Benoit Calmes. REPONSES ADAPTATIVES D'ALTERNARIA BRASSICICOLA AU STRESS OXYDATIF LORS DE L'INTERACTION AVEC LES BRASSICACEES. Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases. Biologie végétale. Université d'Angers, 2011. Français. NNT: . tel-00663349

**HAL Id: tel-00663349**

**<https://theses.hal.science/tel-00663349>**

Submitted on 26 Jan 2012

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

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

**REPONSES ADAPTATIVES D'ALTERNARIA  
BRASSICICOLA AU STRESS OXYDATIF LORS DE  
L'INTERACTION AVEC LES BRASSICACEES**

**Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases**

**Thèse de doctorat**

**Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale  
Ecole Doctorale VENAM**

Présentée et soutenue publiquement le 18 Juillet 2011  
à la Faculté des Sciences d'Angers

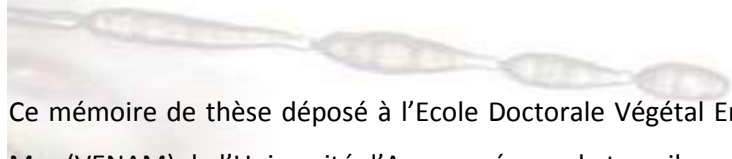
**par Benoit Calmes**

**Devant le jury ci-dessous :**

Mme Esnault MA	Maître de conférence de l'Université de Rennes	Rapporteur
Mr Lemoine R	Directeur de recherche au CNRS de Poitiers	Rapporteur
Mr Simier P	Professeur à l'Université de Nantes	Examineur
Mr Gelhaye E	Professeur de l'Université de Nancy	Examineur
Mr Dat J	Professeur de l'Université d'Angers	Examineur
Mr Guillemette T	Maître de conférence de l'Université d'Angers	Co-encadrant de thèse
Mr Simoneau P	Professeur de l'Université d'Angers	Directeur de thèse

Equipe « Complexes Fongiques Nécrotrophes »  
UMR PaVé77-Pathologie Végétale, Faculté des Sciences  
2, Bd Lavoisier, 49045 Angers cedex (France)

## Avant-propos



Ce mémoire de thèse déposé à l'Ecole Doctorale Végétal Environnement Nutrition Agroalimentaire Mer (VENAM) de l'Université d'Angers, résume le travail que j'ai réalisé depuis Octobre 2007 à l'UMR 77 PaVé dans l'équipe Complexes Fongiques Nérotrophes (CFN). Cette thèse a été financée par un contrat d'allocataire de recherche pendant 3 ans et un contrat de chargé d'enseignement à l'Université d'Angers pendant 1 an.

Benoit Calmes

[Calmes.b@gmail.com](mailto:Calmes.b@gmail.com) / <http://benoitcalmes.wordpress.com/>

## Résumé

L'induction par un hôte d'un stress oxydatif chez un parasite représente l'une des stratégies de défense chimique les plus répandues. Chez les *Brassicacées*, famille de plantes comprenant des espèces à fort intérêt agronomique comme le chou ou le colza, ou d'intérêt scientifique comme *Arabidopsis thaliana*, le stress oxydatif peut être généré soit par des formes actives d'oxygène libérées au niveau de la zone d'agression lors du *burst* oxydatif soit par des molécules issues du métabolisme secondaire de la plante telles que les isothiocyanates (ITC). Bien que fortement exposé à un tel stress lors de l'infection, *Alternaria brassicicola*, champignon pathogène nécrotrophe inféodé aux Brassicacées, est capable d'accomplir son cycle parasitaire et donc de s'y adapter. Cette thèse met en évidence que la tolérance du champignon aux stress oxydatif est partiellement dépendante du métabolisme du mannitol qui participe à la résistance des conidies lors du *burst* oxydatif *in planta* ou à la protection contre les dommages intracellulaires des FAO générées par les ITC lors des phases précoces de l'interaction. Les travaux réalisés montrent également que la charge fongitoxique des dérivés des glucosinolates peut être inhibée par leur conjugaison au glutathion via des Glutathion-S-transférases (GST) spécifiques. L'altération du métabolisme du mannitol ou l'inactivation de ces GST diminue significativement le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* et la régulation de ces voies métaboliques est donc à considérer dans l'optique de développer de nouvelles stratégies de protection des cultures.

---

Mots clefs : *Alternaria brassicicola*, pouvoir pathogène, stress oxydatif, isothiocyanate, mannitol, glutathion-s-transférase

## Sommaire



<b>Avant-propos</b> .....	2
<b>Sommaire</b> .....	3
<b>Remerciements</b> .....	6
Liste des abréviations : .....	8
<b>Contexte bibliographique</b> .....	9
1. Introduction générale .....	10
2. <i>Alternaria brassicicola</i> le modèle d'étude .....	14
2.1. Le genre <i>Alternaria</i> .....	14
2.2. <i>Alternaria brassicicola</i> .....	16
2.3. Le cycle infectieux .....	16
2.4. Les moyens de lutte .....	17
2.5. Le pathosystème <i>A. brassicicola</i> / Brassicacées .....	19
2.6. Le déterminisme du pouvoir pathogène .....	25
3. Le stress oxydatif comme mécanisme de défense contre les microorganismes pathogènes ..	29
3.1. Les formes actives d'oxygène .....	29
3.2. Les Isothiocyanates .....	31
4. Mécanismes fongiques liés à la réponse adaptative aux stress oxydatifs .....	32
4.1. Implication du métabolisme du mannitol dans la réponse adaptative fongique .....	32
4.2. Rôle du cycle du glutathion dans les mécanismes de protection .....	36
<b>Problématique</b> .....	41
<b>Chapitre 1 : Etude du rôle du mannitol dans la protection contre les stress oxydatifs et dans l'expression du pouvoir pathogène d'<i>A. brassicicola</i></b> .....	42
1. Chapitre 1.a : Rôle du mannitol produit et accumulé par <i>A. brassicicola</i> lors de l'interaction avec la plante hôte .....	44
1.1. <i>A. brassicicola</i> , champignon producteur et accumulateur de mannitol .....	44
1.2. Caractérisation de gènes des voies métaboliques du mannitol chez <i>A. brassicicola</i> .....	46
1.3. Analyse des séquences potentiellement régulatrices dans les séquences promotrices des gènes <i>Abmdh1</i> et <i>Abmpd1</i> .....	47
1.4. Expression des gènes du métabolisme du mannitol .....	47
1.5. Mutagenèse dirigée chez <i>A. brassicicola</i> : création de mutants nuls dans les gènes du métabolisme du mannitol .....	48

1.6.	Dosage des sucres solubles présents dans les différents génotypes d' <i>A. brassicicola</i> .....	50
1.7.	Phénotypage des paramètres de croissance des mutants du métabolisme du mannitol	51
1.8.	Réponses des mutants du métabolisme du mannitol aux stress oxydatifs .....	52
1.9.	Sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol à la phytoalexine brassinine .....	54
1.10.	Tolérance aux stress thermiques .....	54
1.11.	Réponse des mutants du métabolisme du mannitol à des stress hydriques et osmotiques .....	55
1.12.	Importance des voies du métabolisme du mannitol dans l'assimilation de ressources carbonées .....	56
1.13.	Etude de l'expression du pouvoir pathogène des mutants du métabolisme du mannitol	57
1.14.	Synthèse et discussion des résultats .....	61
2.	Chapitre 1.b : Etude du transport du mannitol dans l'interaction <i>A. brassicicola</i> / <i>Brassicacées</i>	66
2.1.	<i>A. brassicicola</i> , champignon sécréteur de mannitol .....	66
2.2.	Recherche d'un transporteur de mannitol potentiel dans le génome d' <i>A. brassicicola</i> ...	66
2.3.	Expression du gène <i>Abtp1 in planta</i> .....	68
2.4.	Expression hétérologue du gène <i>Abtp1</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	68
2.5.	Obtention et validation d'un mutant nul <i>AbΔtp1</i> .....	68
2.6.	Impact de la délétion du gène <i>Abtp1</i> sur le métabolisme des sucres .....	68
2.7.	Impact de la délétion du gène <i>Abtp1</i> sur la sécrétion de mannitol .....	69
2.8.	Phénotypage des paramètres de croissance des mutants <i>Abtp1</i> .....	69
2.9.	Réponses des mutants <i>Abtp1</i> aux stress oxydatifs .....	70
2.10.	Rôle d' <i>AbTP1</i> dans l'expression du pouvoir pathogène .....	70
2.11.	Synthèse et discussion des résultats .....	71
3.	Conclusion intégrative sur le rôle du métabolisme du mannitol dans le pouvoir pathogène ..	74
4.	Résultats complémentaires : Importance de transporteurs de mannitol d' <i>A. thaliana</i> dans la tolérance à <i>A. brassicicola</i> .....	75
<b>Chapitre 2 : Etude de mécanismes de détoxification des isothiocyanates, composés de défense des Brassicacées, chez <i>A. brassicicola</i></b> .....		77
1.	Etude transcriptomique de la réponse à l'exposition aux ITC chez <i>S. cerevisiae</i> .....	78
2.	Caractérisation de gènes codant des GST potentiellement impliquées dans la réponse aux ITC chez <i>A. brassicicola</i> .....	79
2.1.	Expression des gènes codant les GST .....	81
2.2.	Mutagenèse dirigée chez <i>A. brassicicola</i> : création de mutants nuls dans les gènes codant les GST potentiellement impliquées dans la réponse aux ITC .....	82

2.3. Sensibilité des mutants <i>AbΔgst</i> face aux ITC.....	83
2.4. Sensibilité des mutants <i>AbΔgst</i> face à la phytoalexine brassinine .....	84
2.5. Activités de conjugaison au glutathion des GST totales de différents géotypes d' <i>A. brassicicola</i> .....	84
2.6. Etude de l'expression du pouvoir pathogène des mutants <i>AbΔgst</i> .....	85
3. Synthèse et discussion des résultats .....	87
<b>Conclusion générale &amp; perspectives</b> .....	91
<b>Matériel et méthodes</b> .....	94
1. Matériels biologiques et conditions de culture.....	95
2. Extraction et dosage des sucres solubles .....	96
3. Méthodes d'analyse des acides nucléiques .....	98
4. Mutagenèse dirigée sur le génome d' <i>A. brassicicola</i> .....	102
5. Caractérisation phénotypique.....	103
6. Outils d'analyse <i>in silico</i> .....	107
7. Article : Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth .....	109
<b>Bibliographie</b> .....	110
<b>Résumé</b> .....	125
<b>Abstract</b> .....	125

## Remerciements

*Même si une thèse est avant tout le seuil d'un avenir professionnel, elle n'est pas moins une aventure personnelle. Elle est jalonnée de rencontres qui sont riches d'enseignements. Beaucoup de personnes ont fait mon quotidien ou n'ont fait que passer un instant. Chacune d'elles a pourtant contribué à faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Je voudrais ici les remercier.*

*Mes travaux ne pourraient avoir de valeur sans la contribution des membres du jury qui ont accepté de juger cette thèse. Je suis reconnaissant envers madame Marie-Andrée Esnault et monsieur Rémi Lemoine ainsi que monsieur Philippe Simier et monsieur James Dat. Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers monsieur Eric Gelhaye qui a eu l'extrême gentillesse de se joindre aux membres du jury.*

*Je voudrais également exprimer ma gratitude envers les membres du comité de suivi de thèse qui ont, par leur écoute et leurs conseils, contribué au bon déroulement et à la cohérence de mes travaux : messieurs Stéphane Poussier, Philippe Delavault, James Dat. Parmi eux, je voudrais tout particulièrement à nouveau remercier monsieur Rémi Lemoine qui m'a également accueilli à de nombreuses reprises dans son laboratoire de Poitiers. J'en profite pour adresser toute ma sympathie à son équipe et notamment à Benoit Porcheron pour sa gentillesse et ses multiples compétences.*

*Cette thèse n'aurait ni vu le jour, ni abouti, sans l'immense contribution de mon directeur de thèse Philippe Simoneau. Malgré la somme de ses responsabilités, sa disponibilité et sa patience n'ont jamais manqué. Je lui suis reconnaissant de m'avoir accueilli dans son équipe et confié ce sujet, me donnant cette chance de faire une thèse. Merci Philippe de m'avoir appris à donner le meilleur de moi-même et surtout pour ton investissement sans limite.*

*La présence au quotidien de Thomas Guillemette, encadrant de thèse, m'a été tout au long de ces années, indispensable. Tes conseils dépassant parfois le cadre du laboratoire m'ont été d'une aide précieuse pour la thèse et dans la vie. Tu as toujours su me guider avec passion sur le droit chemin. Merci de ton soutien sans faille qui m'a permis de m'améliorer sinon corriger un bon nombre de mes défauts.*

*Il ne peut pas y avoir eu plus proche de moi que mes deux inséparables compagnons Stéphanie Pochon et Aymeric Joubert, partageant ensemble notre bureau, le labo, nos rires, nos soucis. Je ne saurais, par les mots, exprimer ma gratitude envers vous. Je vous dois beaucoup tant sur le plan professionnel que personnel. Steph, tu es la tempérance incarnée, un phare dans la tempête qui a toujours été là pour m'épauler. Ton aide, en particulier lors des TP, fut salvatrice pour moi. Tu es promise à réussir que ce soit dans ta vie personnelle que professionnelle, j'en suis persuadé. Tu as su avec humour et tolérance m'accepter. Pour tout ce que tu as fait : Merci. Aymeric, à tes côtés j'ai appris tellement de choses notamment sur moi. Tu donnes ton amitié sans retenue avec une sincérité jamais égalée. Tu as toujours été là pour me soutenir dans les pires moments notamment grâce à nos intarissables discussions. Tu es quelqu'un d'extraordinaire destiné à accomplir de grandes choses. Notre complicité au labo et dans la vie, incarne les meilleurs souvenirs de cette thèse. Je sais que quoi qu'il advienne je peux compter sur toi, et tu sais qu'il en est de même pour toi.*

*La vie au laboratoire a également été rythmée par les membres de notre équipe CFN. Je tiens à les remercier tous et particulièrement Bruno qui est un secours constant pour tous les problèmes et questions de tous genres. Autant dans la gestion et la sécurité du labo que dans la préparation des travaux pratiques, ton aide a été un atout sans équivalent sans lequel je n'aurai pu réussir. Merci également à Nelly qui a toujours été là pour répondre à mes questions même les plus stupides. Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire mes premiers pas dans l'enseignement par le biais de l'école de l'ADN. Je voudrais présenter mon affection à Claire et Pascal pour leurs attentions durant ces années. Enfin je souhaite toute la réussite qu'ils méritent aux nombreux stagiaires qui ont, tour à tour, contribué à la bonne ambiance du labo.*

*J'ai bénéficié tout au long de cette thèse de l'aide de personnes formidables qui ont apporté une contribution significative à certaines de mes manip'. Je pense notamment aux collaborations avec Pietrick Hudomme pour les extraits des sucres solubles des premières années ; Benjamin Siegler pour mon initiation à la RMN ; David Guillet et Julia Gatto pour le dosage des ergostérols ; Julia Buitink et Pascale Satour (Pascale tu auras été un rayon de soleil débordant de générosité) pour les dosages HPLC ; Sylvain Hanteville pour la culture indispensable des choux ; Marie-Noëlle Brisset et Matthieu Gaucher pour les tests DPPH. A vous tous merci. Je voudrais aussi faire part de mon amitié à mes collègues du 2<sup>e</sup> étage du bâtiment F, l'équipe de PMS, Didier Peltier ou encore Romain Berruyer et au-delà des locaux de l'université, Tristan Boureau. Je tiens à citer Emilie Bomal, responsable administrative du collège doctoral d'Angers, qui tous les jours œuvre pour les doctorants. Merci de ton investissement pour la valorisation du diplôme et l'intégration des jeunes docteurs.*

*Entre tous, celle qui mérite le plus mon entière reconnaissance est mon Amour, Lucie. Sa générosité sans égal, sa patience et son optimisme à toute épreuve ont eu raison de toutes les situations difficiles. Grâce à toi, j'ai réussi à voir et vouloir un avenir meilleur que je souhaite de tout cœur jamais éloigné de toi. Ma plus grande et plus belle aventure sera de fonder ensemble une famille aussi forte que tu l'es. Je t'aime.*

*Mon équilibre se construit en grande partie grâce à mon proche entourage. C'est pourquoi ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amis qui m'accompagnent dans les bons et les mauvais moments. Puissions encore et encore partager et créer ces souvenirs qui me sont si chers. Merci à vous tous. A ma sœur qui m'a un jour dit « que tes rêves soient grands pour que jamais tu ne les perdes de vue ». Tu avais raison. A mon frère qui mieux que quiconque m'a enseigné ce que volonté signifie. A ma mère et mes grands parents qui ont tant investi, puissent-ils être fiers de moi.*

*A HPL qui, avant tout le monde, avait compris la vraie nature des champignons.*



**Liste des abréviations :**

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire d'un ARNm
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
BET	bromure d'éthyldium
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	désoxynucléotide 5' triphosphate
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylènediamine tétraacétate
FAO	Forme active d'oxygène
g	accélération de la pesanteur
GS	glucosinolates
GST	Glutathionne-S-Transférase
HOG	High Osmolarity Glycerol
HST	host-specific toxin
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thio galactopyranoside
ITC	isothiocyanate
kDa	kilo Dalton
NHST	non host-specific toxin
ORF	cadre ouvert de lecture (« open reading frame »)
PCR r	éaction de polymérisation en chaîne (« polymerase chain reaction »)
pH	potentiel Hydrogène
qsp	quantité suffisante pour
RNase	ribonucléase
rpm	rotations par minute
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
TAE	tris acétate EDTA
Tris	tris-hydroxyméthyl-aminoéthane
UV	ultraviolets
X-Gal	5-bromo 4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

**Unités internationales :**

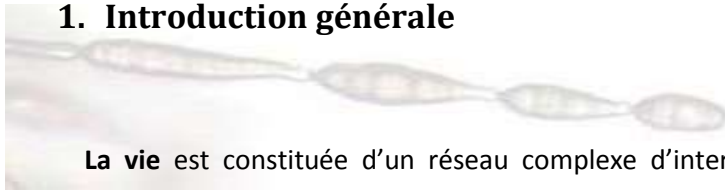
°C	degré Celsius
Da, kDa	Dalton, kilodalton
g, mg, $\mu$ g, ng	gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
j, h, min, sec	jour, heure, minute, seconde
l, ml, $\mu$ l	litre, millilitre, microlitre
M, mM, $\mu$ M,	molaire, millimolaire, micromolaire
RNU	Unité néphélométrique
V	volt

## Contexte bibliographique



## Contexte bibliographique

### 1. Introduction générale



La vie est constituée d'un réseau complexe d'interactions entre les différents organismes peuplant notre planète. La nature de ces interactions est plurielle. Elles peuvent par exemple bénéficier aux deux êtres vivant en relation, on parle de mutualisme. Il existe aussi le cas où un organisme vit au dépend d'un autre. Ce type d'interaction est nommé parasitisme. Il implique une association entre deux espèces. Le parasite peut coloniser son hôte pour réaliser son cycle de vie au détriment de ce dernier. Cette interaction peut se traduire par l'apparition d'une maladie conduisant parfois à la mort de l'hôte. Tous les organismes vivants sont susceptibles d'être les proies d'un agent pathogène, toutefois certaines conditions favorisent leur implantation et leur propagation. C'est le cas par exemple de l'agriculture qui, dès son origine, a créé des conditions favorables à leur multiplication. Parmi les parasites responsables des maladies sur plantes cultivées, plus de la moitié appartiennent au règne des champignons. L'exemple en 1970 de l'épidémie foudroyante du champignon *Helminthosporium maydis* sur maïs aux Etats-Unis d'Amérique démontre l'impact dramatique que peuvent avoir les maladies de type fongique sur les cultures agricoles et ainsi sur la disponibilité des denrées alimentaires. L'augmentation considérable de la population humaine sur terre notamment dans les milieux urbains, a considérablement transformé l'agriculture moderne. Elle s'intensifie, se spécialise et se concentre, créant ainsi un climat favorable à l'émergence d'agents pathogènes. L'utilisation excessive de produits chimiques pour limiter les attaques des parasites soulève des problèmes de santé ou de préservation de l'environnement, exerce une pression de sélection sur les agresseurs. La résolution des problèmes phytopathologiques rencontrés dans la pratique agronomique repose en grande partie sur une connaissance approfondie du pathosystème et de son environnement. Ceci est d'autant plus évident dans le contexte actuel, qui tend à privilégier des pratiques de lutte respectueuses de l'environnement et de la santé publique. La mise en œuvre de l'objectif de « réduction de moitié des usages des pesticides en accélérant la diffusion des méthodes alternatives sous réserve de leur mise au point » du plan *Ecophyto 2018* renforce par exemple la nécessité d'étudier en détail les interactions plantes/agents pathogènes.

Parmi les problèmes sanitaires causés par les champignons dans les systèmes de culture, la transmission des maladies fongiques par les semences suscite particulièrement l'attention des professionnels. Afin de proposer de nouvelles stratégies de lutte contre les champignons transmissibles par les semences, l'équipe Complexes Fongiques Nérotrophes de l'UMR A77 Pathologie Végétale d'Angers qui est le laboratoire porteur de ce projet de thèse, a engagé, depuis

plusieurs années, une étude approfondie sur les mécanismes moléculaires régissant l'interaction nécrotrophe en choisissant comme modèle le pathosystème *Alternaria brassicicola* / Brassicacées. L'espèce modèle étudiée fait partie d'un complexe fongique nécrotrophe responsable de la maladie de la tache noire ou « black spot » des plantes de la famille des Brassicacées, qui compte en son sein nombre d'espèces cultivées comme le chou, la moutarde ou le colza mais aussi la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ce champignon phytopathogène, transmissible par les semences est à l'origine d'importants dégâts sur les plantes hôtes cultivées, provoquant ainsi des pertes financières conséquentes pour les producteurs. A ce jour, il n'existe pas de variétés résistantes commercialisées. Les méthodes de lutte disponibles consistent en un contrôle sanitaire des semences et l'application de fongicides en végétation ou sur semences. Cependant, l'apparition d'isolats hautement résistants aux fongicides de type dicarboximide, très utilisés pour lutter contre cette maladie, a pu être constatée (Iacomi-vasilescu *et al.*, 2004).

Pour lutter de manière efficace contre un champignon phytopathogène, il est nécessaire en premier lieu de bien connaître les mécanismes qui régissent l'interaction avec la plante hôte. Lorsqu'un agent pathogène entre en contact avec un hôte potentiel, un dialogue moléculaire se met en place entre les deux partenaires. Outre les facteurs trophiques produits par le pathogène, le succès d'une infection dépend de la capacité de celui-ci à neutraliser ou contourner les défenses de son hôte. Ces défenses peuvent être de nature physique, comme par exemple, un dépôt de callose pour limiter la progression des parasites vasculaires ou un renforcement des parois extérieures pour rendre plus difficile la pénétration. Le parasite peut également être confronté aux défenses chimiques de la plante hôte. Parmi celles-ci, il existe des molécules aux propriétés antimicrobiennes qui peuvent être soit accumulées de manière constitutive, et sont alors nommées phytoanticipines, soit être synthétisées *de novo* lors de l'interaction avec l'agent pathogène, et sont alors nommées, phytoalexines. Ces molécules ne sont pas les seules défenses chimiques des végétaux. Dès la détection d'une agression, une plante peut produire très rapidement un stress oxydatif localisé sur la zone d'infection. Ce *burst* oxydatif généré notamment par des formes actives d'oxygène (FAO) a un effet létal pour les cellules aussi bien du parasite que de la plante hôte. Les FAO produites peuvent également jouer un rôle de molécules-signal qui vont induire les mécanismes de défense de la plante infectée. Aussi, la résistance à ce choc oxydant est une étape clé de la phase infectieuse d'un champignon phytopathogène.

Lors de son interaction spécifique avec les plantes de la famille des Brassicacées, *A. brassicicola* est confronté à des molécules de défense de nature indolique. Parmi ces composés, issus du métabolisme secondaire et spécifiques des Brassicacées, les isothiocyanates (ITC) possèdent une activité antimicrobienne relativement forte (Sellam *et al.*, 2007a). Ils sont issus de la dégradation des

glucosinolates lors de l'endommagement des tissus végétaux dans le cas d'une intrusion parasitaire par exemple. L'analyse du transcriptome d'*A. brassicicola* en présence d'Allyl-ITC (AI-ITC) réalisée au préalable au laboratoire a permis de mettre en évidence 76 expressed sequence tag (EST), dont plus d'un tiers correspondent à des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et en particulier de nombreux gènes spécifiques du cycle du glutathion (Sellam *et al.*, 2007). Une stratégie possible de protection d'*A. brassicicola* contre le stress oxydatif pourrait consister à agir directement sur les effets des ITC en inhibant en amont la génération de FAO intracellulaires. Des mécanismes de détoxification des ITC pourraient ainsi exister. Parmi les EST identifiées par Sellam *et al.* (2007), cinq codent des enzymes glutathion S-transférases (GST) putatives. Cette famille d'enzymes est connue pour être impliquée dans des mécanismes de détoxification de xénobiotiques (Dixon *et al.*, 1998). Il a également été montré chez *A. brassicicola* qu'une GST nommée *AbGST1*, inductible par les ITC et *in planta* lors de l'interaction avec la plante hôte, avait comme substrat privilégié les ITC (Sellam *et al.*, 2006). Ces résultats ont conduit à élaborer un modèle pour la détoxification des ITC par le champignon dans lequel ces composés pourraient être complexés au glutathion par l'action de GST pour être soit séquestrés dans la vacuole soit expulsés dans le milieu extérieur.

La génération de FAO intracellulaires par les ITC a été par la suite confirmée à l'aide des sondes H<sub>2</sub>DCFDA et DHE qui fluorescent spécifiquement en présence de FAO (Sellam *et al.*, 2007). Ainsi le stress oxydatif exercé sur le pathogène lors de l'interaction avec une plante hôte de la famille des *Brassicacées* se manifeste à la fois au niveau extracellulaire (*burst* oxydatif) et au niveau intracellulaire (exposition aux ITC). Le succès d'une infection doit donc être, au moins en partie, lié à la production par le pathogène de facteurs de protection ou de contournement des défenses de l'hôte dont fait parti le stress oxydatif. Ces mécanismes qui permettent à *A. brassicicola* de tolérer le choc oxydatif auquel il est soumis lors de l'interaction avec les *Brassicacées* ne sont pas clairement définis à ce jour. Les stratégies de protection du champignon peuvent se situer à différents niveaux, comme par exemple une réponse non spécifique visant à limiter globalement le pouvoir oxydant des FAO ou à l'inverse, une réponse spécifique ciblée sur les ITC pour entraver leur capacité à générer un stress oxydatif.

Les propriétés oxydantes des FAO peuvent être inhibées par l'action de molécules particulières. Ces molécules peuvent désactiver un état excité d'une autre entité moléculaire par transfert d'énergie, par transfert d'électron ou par un mécanisme chimique. Cette réaction est appelée quenching. Certains sucres possédant des fonctions alcools (polyols) sont connus dans la littérature pour leur pouvoir antioxydant par quenching des FAO. C'est le cas du mannitol dont certaines études ont démontré qu'il possède la propriété de neutraliser les FAO (Jennings *et al.*, 1998). Le mannitol est le polyol le plus représenté chez les champignons. De nombreuses fonctions

lui sont attribuées, notamment dans les processus de protection contre divers stress. La littérature fait également état de champignons capables de sécréter du mannitol durant l'interaction (Jennings *et al.*, 2002 ; Voegele *et al.*, 2005). Ce contexte scientifique permet d'élaborer l'hypothèse que, pour se protéger du stress oxydatif, certains champignons pathogènes disposeraient d'un système d'inhibition de ces FAO via la production, l'accumulation ou la sécrétion de mannitol.

Les travaux décrits dans cette thèse constituent une contribution à la compréhension des mécanismes de résistance au stress oxydatif chez *A. brassicicola*. Ils sont axés d'une part sur le rôle du mannitol dans la cellule fongique et plus particulièrement dans la réponse au stress oxydatif et d'autre part sur l'implication des GST dans la réponse aux ITC lors de l'interaction avec la plante hôte.

## 2. *Alternaria brassicicola* le modèle d'étude



Ce travail de thèse a pour objectif d'apporter une contribution à l'étude des déterminants du pouvoir pathogène des champignons responsables de maladies chez les plantes cultivées. Les pathogènes peuvent avoir plusieurs stratégies parasitaires déterminées par leur mode de nutrition sur la plante. Ils peuvent, par exemple, avoir un comportement **biotrophe** et dans ce cas établir une relation trophique avec les cellules vivantes des tissus hôtes à partir desquelles ils vont détourner leurs nutriments. A l'inverse certains pathogènes vont très rapidement tuer les cellules des tissus infectés notamment par l'action de toxines puis coloniser les tissus morts en quasi saprophytes. Ils sont responsables de symptômes nécrotiques et sont dits **nécrotrophes**. *A. brassicicola* qui fait l'objet de l'étude décrite dans ce manuscrit fait partie de cette classe de pathogènes. Lors de l'infection, ils induisent fortement les réactions de défense de l'hôte et la réussite de leur cycle infectieux est liée à leur capacité à se protéger contre celles-ci. Ils constituent ainsi un modèle d'étude idéal pour la compréhension des mécanismes mis en place par les champignons pathogènes pour se protéger des défenses de la plante hôte.

### 2.1. Le genre *Alternaria*

La **classification des champignons** a longtemps été uniquement basée sur des critères morphologiques et le mode de reproduction. Selon cette nomenclature, Nees décrit pour la première fois en 1816, un champignon qu'il nomme *Alternaria tenuis*. Le **genre *Alternaria*** a, par la suite été décrit par Groves et Skolko (1944), Neergaard (1945), Joly (1964) et Simmons (1967, 1986, 1992). Il est classé parmi les *Deuteromycetes Dematiaceae*, formant un mycélium cloisonné brun ne présentant aucun mode de reproduction sexuée connu. Les champignons appartenant au genre *Alternaria* se multiplient de manière asexuée à partir de filaments spécialisés appelés conidiophores où vont être différenciées des conidies (ou spores), brunes également, très caractéristiques du genre, organisées en chaînette. Ce sont des dictyospores : conidies piriformes, à la base élargie avec des *septa* transversaux, obliques et longitudinaux en nombre variable. Leur extrémité est constituée d'une partie rétrécie plus ou moins longue appelée le « bec ». L'aspect global rappelle la forme d'une massue. Elles mesurent entre 50-100  $\mu\text{m}$  de long et 3-16  $\mu\text{m}$  de large (**figure 1**).

La complexité taxonomique des *Alternaria* liée à leur diversité et leur hétérogénéité a généré de nombreuses classifications. L'émergence de la taxonomie moléculaire basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques, a abouti au classement du genre parmi les **Ascomycètes** (**figure 2**) au sein de la classe des Dothideomycètes. Ils sont phylogénétiquement proches de nombreuses espèces

phytopathogènes (comme *Leptosphaeria*, *Venturia*, *Pleospora*, *Phaeosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium*, *Pyrenophora*, *Clochiobolus* etc.).

Le genre *Alternaria* regroupe plus de 100 espèces ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments (Joly, 1964 ; Ellis, 1971, 1976 ; Simmons 1992). Si certaines espèces vivent à l'état saprophyte pouvant occasionnellement être des agents pathogènes opportunistes, d'autres sont responsables de maladies atteignant les plantes et les insectes. En **pathologie humaine**, huit espèces d'*Alternaria* ont été clairement identifiées (*A. alternata*, *A. chartarum*, *A. tenuissima*, *A. chlamydospora*, *A. infectoria*, *A. dianthicola*, *A. geophila*, *A. stemphyloides*). Il s'agit là principalement d'opportunistes provoquant des infections cutanées, des sinusites, des otites ou des atteintes de la cornée (Schell, 2000 ; Ferrer *et al.*, 2002), en particulier chez les patients immunodéprimés ou favorisées par certains facteurs comme le diabète mal équilibré ou la corticothérapie (Morrison *et al.*, 1993 ; Vartivarian *et al.*, 1993). *A. alternata* est l'espèce la plus souvent incriminée en particulier dans les cas d'allergie. En effet même si le genre *Alternaria* ne représente que 1,2% de la flore fongique totale, il constitue un allergène dominant dont le rôle dans l'asthme est trop souvent négligé.

Cependant la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des **champignons phytopathogènes** inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement. Ils sont généralement présents sur les semences provoquant des manques à la levée ou des fontes de semis. Les jeunes pousses atteintes constituent une source importante d'inoculum primaire pour les plantes matures où tous les organes aériens peuvent être affectés (Champion, 1997). La gamme de plantes hôtes concernées par l'alternariose est très variée et certaines espèces peuvent provoquer d'importants dégâts sur des espèces cultivées occasionnant des pertes financières significatives. C'est le cas, par exemple d'*A. triticina* sur les céréales, *A. dauci* et *A. radicina* sur cultures maraîchères comme la carotte. *A. brassicicola* qui fait parti d'un complexe fongique avec *A. japonica* et *A. brassicae*, est responsable de la maladie de la tache noire spécifique des *Brassicacées*, famille végétale qui comprend notamment le chou (*Brassica oleracea*), la moutarde (*Brassica juncea*) ou le colza (*Brassica napus*).



## 2.2. *Alternaria brassicicola*

Sur milieu de culture solide de type malt-agar, les colonies mycéliennes sont de taille variable, d'un contour très régulier (**figure 3**). Le mycélium apparaît ras, peu développé, d'aspect velouté et de couleur marron olivâtre en raison d'une sporulation abondante. Les conidiophores simples ou ramifiés produisent des chaînes de 10 à 15 conidies. Celles-ci mesurent de 20 à 75 µm de long et 10 à 18 µm de large. Elles sont de couleur olivâtre jusqu'à marron à maturité, lisses et peu rigides. Elles présentent essentiellement des cloisons transversales marquées à leur niveau par un rétrécissement du contour de la conidie (Guillemette, 2003).

Les **conidies** (**figure 4**) sont actuellement, le seul moyen connu de reproduction pour *A. brassicicola*. Il s'agit d'un mode de **multiplication asexué** qualifié parfois de clonal. Cependant une étude sur le polymorphisme de plusieurs isolats d'*A. brassicicola* montre un important flux génétique entre cinq populations réparties sur différents sites de la côte australienne. Les auteurs concluent qu'il ne peuvent réfuter l'hypothèse de l'existence d'un mode de reproduction sexuée jusqu'ici inconnu dans le cycle de vie du champignon (Bock *et al.*, 2005).

Le génome d'*A. brassicicola* a été séquencé en 2004 (Genome Sequencing Center, University of St Louis) et est disponible sur le lien <http://www.jgi.doe.gov/>. Sa gamme d'hôte restreinte à la famille des *Brassicacées* comprend notamment la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. La disponibilité des séquences génomiques et de stratégies de mutagénèse dirigée pour les deux protagonistes, font de l'interaction *A. brassicicola*/*A. thaliana* un **pathosystème modèle de l'interaction nécrotrophe**.

## 2.3. Le cycle infectieux

*A. brassicicola* possède la **propriété de se conserver sur les semences** et peut inhiber la germination provoquant des manques à la levée. Si toutefois la graine germe, la maladie peut se déclarer sur les plantules entraînant une fonte des semis. Cependant les symptômes les plus caractéristiques sont observables sur les feuilles des plantes matures. La tache nécrotique typique des alternarioses est à l'origine du nom commun de la maladie dit de la « tâche noire » (ou « black spot »). Elle est entourée par un halo jaune qui est la manifestation de l'action des toxines fongiques qui tuent les cellules végétales à la périphérie de la lésion. La zone nécrosée est le lieu de production des conidies qui vont assurer la propagation de la maladie à toutes les parties aériennes des *Brassicacées* environnantes. Ainsi des symptômes sur tiges, sur feuilles ou sur siliques sont observables. La contamination des inflorescences comme par exemple les pommes ou têtes de choux rendent le produit invendable voire impropre à la consommation. La contamination des siliques permet d'amorcer un nouveau cycle. La présence de nombreuses nécroses sur les siliques provoque

leur ouverture prématurée. Les pertes de rendement sont très variables suivant la précocité et l'intensité des symptômes. L'agent pathogène peut également rester à l'état latent sur des résidus de cultures contaminés et constitue une réserve d'inoculum (**figure 5**).

#### 2.4. Les moyens de lutte

Pour avoir un aperçu de la réalité des solutions proposées, en particulier aux agriculteurs, pour se prémunir des dégâts occasionnés par l'alternariose au champ, les fiches techniques de groupes phytosanitaires ont été consultées :

**Fiche technique pour se prémunir de l'alternariose sur Colza**  
**éditée par Syngenta®**

**Variété** : il n'existe pas de tolérance variétale.

**Protection des semences** : utiliser des semences traitées.

**Mesures agronomiques** : enfouir les résidus de culture.

**Traitement chimique préventif** des parcelles à risque au stade G4 du colza.

**Traitement curatif** : dès l'apparition des premiers symptômes sur siliques.

✓ Utilisation de fongicides

Ainsi une des principales recommandations est un recours aux **fongicides**. Les différentes matières actives homologuées utilisées actuellement dans les programmes de lutte contre les *Alternaria* appartiennent aux familles chimiques des imides cycliques, des carbamates et des triazoles (Iacomi-Vasilescu, 2004). La protection offerte par ces fongicides s'étend également à d'autres pathogènes des *Brassicacées*, notamment aux champignons *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Botrytis cinerea*. Sur végétation, les traitements préventifs permettent un meilleur contrôle de la maladie. Leur déclenchement doit se raisonner en fonction des conditions climatiques (l'alternariose se manifeste principalement par temps chaud avec une humidité saturante) et du risque potentiel de maladie sur la parcelle. D'autre part, le dernier traitement doit impérativement intervenir trois semaines avant la récolte pour éviter tout risque de résidus. Cependant, l'apparition d'isolats d'*A. brassicicola*, hautement **résistants aux fongicides** de type dicarboximide, a pu être constatée (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004; Avenot *et al.*, 2005). Ce cas de figure est la conséquence d'une utilisation répétée et non raisonnée des fongicides aboutissant ainsi à la diminution de l'efficacité des traitements. Outre les risques écotoxiques, ces résultats démontrent que l'utilisation de fongicide n'est pas une solution durable. Il a cependant été montré que la résistance aux dicarboximides avait un coût de fitness pour *A. brassicicola* notamment une baisse de la compétitivité en particulier au moment de la transmission aux semences (Iacomi *et al.*, 2008).

✓ Les variétés résistantes

Un autre moyen proposé dans certains cas pour lutter contre les maladies fongiques consiste à utiliser des **variétés résistantes**. Néanmoins, de telles variétés, qui doivent combiner une résistance aux agents pathogènes et des avantages culturels, ne sont pas toujours disponibles. Actuellement, les variétés cultivées de *Brassica* sont toutes sensibles à l'alternariose (Tewari, 1991). Il existe cependant des sources potentielles de résistance parmi les crucifères sauvages (Sharma *et al.*, 2002). Des niveaux de résistance élevés ont ainsi été rapportés chez *Sinapsis alba* (Saharan, 1993 ; Hemingway, 1995), *B. juncea* (Kolte *et al.*, 2000), *B. carinata* (Choudhary *et al.*, 2000), *C. sativa* (Hansen, 1998 ; Sharma *et al.*, 2002), *B. nigra* (Westman *et al.*, 1999), *B. maurorum* (Chrungu *et al.*, 1999) et *C. bursa-pastoris* (Conn *et al.*, 1988). Certaines espèces sont particulièrement intéressantes car elles présentent des résistances multiples à plusieurs agents pathogènes (Hansen et Earle, 1997). De gros efforts sont actuellement réalisés pour transférer ce caractère aux variétés cultivées et créer des hybrides performants et tolérants à l'alternariose. Des croisements interspécifiques et des fusions de protoplastes entre *S. alba* et des espèces cultivables (*B. oleracea* et *B. juncea*) ont déjà permis l'obtention de génotypes présentant des niveaux de résistance à *A. brassicae* plus élevés (Sharma et Singh, 1992 ; Hansen et Earle, 1997). Cependant, l'intégration de tels génotypes dans les programmes de culture n'a pas encore été réalisée jusqu'à maintenant. Les hybrides présentaient notamment une faible production de pollen.

✓ La protection biologique intégrée

Quelques microorganismes semblent exploitables en vue de développer une lutte biologique contre les champignons *Alternaria* pathogènes des Brassicacées, mais leur utilisation est très marginale. Des travaux rapportent ainsi l'effet antifongique exercé par des bactéries du genre *Streptomyces* sur *A. brassicicola* à la fois au laboratoire et au champ (Sharma *et al.*, 1984 ; Valkonen et Koponen, 1990). Igarashi *et al.* (2000) ont notamment isolé un métabolite produit par *Streptomyces* sp, appelé fistupyrone, qui inhibe *in vitro* le développement d'*A. brassicicola* et limite la contamination des plantules. Des souches de *Bacillus polymyxa* isolées de semences de chou fleur et les champignons antagonistes *Trichoderma harzianum* et *Gliocladium roseum* présentent également un intérêt potentiel comme fongicides naturels efficaces pour contrôler *A. brassicicola* (Sivapalan, 1993; Pichard et Thouvenot, 1999). Récemment, Muto *et al.* (2006) ont montré que des extraits racinaires de la plante *Solanum nigrum*, contenant essentiellement des saponines, inhibent fortement la germination des conidies d'*A. brassicicola* suggérant une éventuelle utilisation de ces produits naturels dans le contrôle de l'alternariose.

✓ Le contrôle sanitaire des semences

La régulation de la maladie se fait aussi en amont des cultures par un **contrôle sanitaire préventif des lots de semences**. Pour être commercialisés, ils doivent être soumis à un contrôle systématique très réglementé afin de vérifier s'ils répondent aux normes européennes qui concernent la faculté germinative, la pureté spécifique ou encore la présence d'organismes nuisibles. Les analyses sont réalisées, conformément aux protocoles reconnus par le SOC (Service Officiel de Contrôle des semences) en référence aux règles de l'ISTA (Association internationale d'essais de semences), soit par le laboratoire de l'entreprise productrice, soit par un laboratoire agréé par le SOC, soit par la Station nationale d'essai de semences (SNES). Les lots de semences ne sont certifiés que s'ils regroupent tous ces critères. Cependant, pour *A. brassicicola* comme pour la plupart des agents pathogènes fongiques, il n'existe pas de normes réglementaires. Par contre il est considéré comme un pathogène de qualité. Le seuil critique de présence du champignon sur les semences est soumis à la loi du marché. Si il est trop élevé, le lot de semences peut être jugé de mauvaise qualité et de ce fait invendable.

## 2.5. Le pathosystème *A. brassicicola* / Brassicacées

- Mécanismes de défenses d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*

*A. thaliana*, plante de la famille des Brassicacées, est depuis les années 1990 le principal modèle pour l'étude des mécanismes de défenses induits. Les ressources génomiques disponibles en font en effet, un outil privilégié pour identifier les voies de signalisation impliquées dans la résistance aux agents pathogènes. L'étude des relations entre différents génotypes d'*A. thaliana* et des agents nécrotrophes a notamment permis de mettre en évidence des voies de défenses dépendante des hormones végétales. Il s'est avéré que les mécanismes de protections induits sont sous contrôle de voies dépendantes de l'acide jasmonique (JA) principalement et de l'éthylène (Thomma *et al.*, 2003 ; Coego *et al.*, 2005). A titre d'exemple, Thomma *et al.* (1998) ont montré que le mutant *coi1-1* insensible au méthyle jasmonate est très sensible à *A. brassicicola* comparé au génotype sauvage suggérant que cette hormone joue également un rôle clef dans l'activation des mécanismes défensifs contre ce champignon. Des analyses portant sur l'intégralité du transcriptome d'*A. thaliana* ont également été menées pour mieux comprendre les mécanismes de défense engagés contre *A. brassicicola*. Dans le cas d'une réponse systémique, Schenk *et al.* (2003) ont par exemple montré que plusieurs gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, dans la synthèse de la paroi cellulaire, dans le métabolisme secondaire, dans les voies de signalisation et dans la résistance aux agents pathogènes sont induits. Une étude protéomique portant sur l'intégralité du sécrétome d'*A. thaliana* au cours de l'interaction avec *A. brassicicola*, a mené à l'identification d'une lipase nommée GSDL

LIPASE1 (GLIP1) qui exerce directement une activité antimicrobienne (Oh *et al.*, 2005) et joue ainsi un rôle clef dans la résistance.

Récemment les travaux conduits par Mukherjee *et al.* (2009 et 2010) visent à définir la nature de l'interaction entre *A. brassicicola* et des écotypes d'*A. thaliana*. Une étude différentielle du transcriptome des écotypes *Colombia* (Col-0) et *Dijon-G* (DiG) lors de l'interaction avec *A. brassicicola* a été menée. Les auteurs évoquent une interaction incompatible avec Col0 et compatible avec DiG. Parmi les gènes surexprimés identifiés dans l'étude du transcriptome de l'écotype DiG d'*A. thaliana*, des gènes codant des Glutathion-S-transférases (GST) ont été retrouvés (Mukherjee *et al.*, 2009). L'analyse du protéome confirme la présence de 6 de ces GST (Mukherjee *et al.*, 2010). Ces enzymes généralement impliquées dans des mécanismes de détoxification de xénobiotiques semblent être un marqueur de l'interaction pathogène.

- Les défenses chimiques des *Brassicacées*

Les plantes sont la proie de multiples parasites et pour se défendre elles ont acquis au cours d'une évolution parallèle avec leurs agresseurs, des mécanismes de protection aussi divers que complexes. Parmi ceux-ci, des métabolites aux propriétés antimicrobiennes, issus du métabolisme secondaire des Brassicacées peuvent constituer une **barrière chimique** contre une large gamme de parasites comme les bactéries, les insectes, les nématodes ou les champignons (Kliebenstein, 2004). Ces composés peuvent être accumulés de manière constitutive dans les tissus de la plante et sont alors appelés **phytoanticipines**. Une deuxième catégorie peut être synthétisée *de novo* lorsqu'une agression parasitaire est détectée. Il s'agit des **phytoalexines**.

- Les phytoalexines majeures des Brassicacées

Il existe de nombreuses **phytoalexines** chez les Brassicacées. La camalexine et la brassinine sont des exemples qui ont suscité de nombreuses études.

- ✓ La camalexine

Chez *A. thaliana*, la camalexine est la phytoalexine majeure (Tsuji *et al.*, 1992). Il s'agit d'un dérivé indolique antimicrobien contenant du soufre ; c'est un homologue structural du thiabendazole, un fongicide systémique utilisé dans le contrôle de plusieurs pathologies végétales. L'inactivation du gène *PAD3* d'*A. thaliana* codant une cytochrome monooxygénase, enzyme clé dans la voie de biosynthèse de la camalexine, altère significativement la résistance contre *A. brassicicola* (Zhou *et al.*, 1999). La camalexine joue donc un rôle primordial dans la résistance contre ce pathogène. Ses propriétés antifongiques inhibent très fortement la croissance

d'*A. brassicicola* en induisant notamment une perméabilisation membranaire chez le champignon (Sellam *et al.*, 2007).

✓ La brassinine

La brassinine est également une phytoalexine d'importance des *Brassicacées*. Elle possède une activité antimicrobienne avérée cependant moins importante que la camalexine (Pedras *et al.*, 2003 et 2007 ; Sellam *et al.*, 2007). Le groupement dithiocarbamate de la brassinine, connu pour être un puissant toxophore présents dans les produits agrochimiques synthétiques, est en partie responsable de son activité antifongique (Pédras *et al.*, 2007).

• Les phytoanticipines majeures des Brassicacées

Une deuxième catégorie de défenses chimiques des végétaux peut être accumulées de manière constitutive dans les tissus de la plante et sont alors appelés **phytoanticipines**.

✓ Les glucosinolates

Malgré la richesse des connaissances accumulées ses dernières années sur les composés antimicrobiens inductibles chez *A. thaliana*, on ne sait encore que peu de chose sur les **phytoanticipines**. Elles ont pourtant un rôle prépondérant dans la résistance des plantes face aux bioagresseurs. Les principales phytoanticipines des Brassicacées sont les glucosinolates (Halkier *et al.*, 2006). Issus du métabolisme secondaire, hétérosides dérivés d'acides aminés, ils sont riches en soufre (thioglucosides). La quasi-totalité des Brassicacées comme le brocoli, le chou, le chou-fleur, le chou de Bruxelles ou le colza sont riches en glucosinolates. Une consommation régulière de ces espèces réduit les risques de cancer ou de maladies cardio-vasculaire (Keck *et al.*, 2004). Cependant consommées à forte dose, elles peuvent avoir sur l'Homme un effet goitrogène lié à l'inhibition de l'absorption de l'iode par la thyroïde. Des variétés de colza à faibles teneurs en glucosinolates dans les graines ont été développées dès le début de la seconde moitié du XXe siècle pour limiter les phénomènes d'inappétence concernant l'utilisation des tourteaux en alimentation animale. Les plantes cultivées contiennent en réalité assez peu de glucosinolates en comparaison des espèces de Brassicacées sauvages considérées comme adventices (Kjae *et al.*, 1959). Les dérivés issus de leur dégradation sont notamment des insecticides puissants mais certains insectes ont, au cours de l'évolution, acquis une tolérance naturelle en faisant même de la présence des glucosinolates une composante essentielle de leur comportement reproducteur (Hopkins *et al.*, 2008). Les mutants d'*A. thaliana* affectés dans la synthèse des glucosinolates, notamment après la délétion du gène *gsm1-1*, sont nettement plus sensibles au champignon *Fusarium oxysporum* (Tierens *et al.*, 2001). Cette sensibilité accrue est cependant moins marquée pour d'autres agents pathogènes comme *A.*

*brassicicola*, *Plectosphaerella cucumerina*, *B. cinerea*, ou *Peronospora parasitica*, ou les bactéries *Erwinia carotovora* et *P. syringae*, mais les auteurs affirment que l'implication des glucosinolates n'est pas à négliger dans la réponse contre les agents pathogènes (Tierens *et al.*, 2001). Les glucosinolates ont également chez les plantes un rôle de molécules signal. Un lien entre le métabolisme des glucosinolates indoliques et l'hormone végétale de croissance indole-3-acetic acid (IAA) a déjà été suggéré (Halkier *et al.*, 2006). Les travaux de Brader *et al.* (2006) montrent que le métabolisme des glucosinolates joue un rôle dans la modulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique, hormone végétale qui régule des mécanismes de défense. L'induction de PR protéines d'*A. thaliana* par les Bz-ITC, produits de dégradation des glucosinolates est également mise en évidence dans cette publication. Les auteurs émettent l'hypothèse que les Bz-ITC puissent mimer une molécule signal impliquée dans la voie de défense dépendante de l'acide salicylique.

#### ✓ La biosynthèse des glucosinolates

Les **glucosinolates** sont classés en trois grands groupes : aliphatiques, indoliques et aromatiques, sur la base des acides aminés à partir desquels ils sont synthétisés (Halkier *et al.*, 2006). La biosynthèse des glucosinolates comporte généralement trois étapes (**Figure 6**) et commence par l'allongement de la méthionine, de la phénylalanine ou du tryptophane. La première étape qui lie un groupement d'hydrocarbure aliphatique est catalysée par la methylthioalkylmalate synthase (MAM). Le groupement 1-méthoxyl des glucosinolates indoliques serait ajouté au tryptophane avant les modifications réalisées par la MAM (Pedras *et al.*, 2009). La suite des modifications sur la structure de base est catalysée par des enzymes de type cytochrome P450, CYP79 et CYP83 qui effectuent des oxydations suivies par un clivage C-S, des glucosylations et des ajouts de groupement sulfate. Les chaînes latérales sont modifiées par oxydation, clivage, alkylation ou estérification (Zang *et al.*, 2009). Certains gènes impliqués dans ces étapes, *FM<sub>OGS-OX1~5</sub>*, *AOP*, *GSL-OH* et *BZO1* ont été identifiés récemment (Hansen *et al.*, 2008 ; Kliebenstein *et al.*, 2007). A ce jour, la majorité des gènes impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates ou sa régulation ont été identifiés chez *A. thaliana* (Halkier *et al.*, 2006). La nature des glucosinolates est fortement dépendante du génotype qui les synthétise.

#### ✓ Les isothiocyanates

Lors d'une rupture de l'intégrité cellulaire, conséquence d'une agression par un parasite par exemple, les compartiments cellulaires sont rompus et les glucosinolates accumulés sont transformés par des thioglucosidases endogènes, les myrosinases stockées initialement dans les vacuoles. Les myrosinases clivent le groupement glucose des glucosinolates, il en résulte des composés à forte activité biologique : **les isothiocyanates (ITC)** mais aussi des nitriles ou des

thiocyanates qui sont également toxiques (**Figure 7**). Certains des produits issus de cette dégradation sont connus pour inhiber la croissance des micro-organismes *in vitro* et *in planta* (Tierens *et al.*, 2001 ; Sellam *et al.*, 2007a). Parmi les myrosinases, PEN2 a été décrit chez *A. thaliana* comme étant directement en lien avec des peroxyosomes associés aux cellules périphériques d'un point de pénétration fongique. Cette myrosinase ainsi induite va générer une forte concentration d'ITC au site d'infection (Bednarek *et al.*, 2009). Il est important de noter que lors de l'interaction plante/pathogène, seule une fraction des glucosinolates sont transformés en ITC, cette proportion libérée est variable selon les tissus infectés de la plante. Des études menées sur *B. napus* supposent que seulement 8% des glucosinolates sont théoriquement hydrolysés en ITC (Zang *et al.*, 2009).

Parmi les ITC formés, le sulforaphane un dérivé de glucophanine, est connu pour être un **agent anticancéreux prometteur** en raison de son large spectre d'activité contre différentes cellules cancéreuses. Il agit sur le métabolisme des œstrogènes et bloque le cycle cellulaire et intervient dans la protection contre les dommages oxydatifs (Zhang *et al.*, 1994 ; Solowiej *et al.*, 2003). Des études récentes ont aussi montré que les isothiocyanates ont une activité anti tumorale, inhibant la croissance de plusieurs types de cellules cancéreuses humaines *in vitro*. Les phényl ITC inhibent la croissance des cellules leucémiques en induisant l'apoptose. Les Benzyl-ITC, ont des effets inhibiteurs sur le développement des cellules en métastase du cancer des poumon (Wu *et al.*, 2011) ou du cancer du sein (Warin *et al.*, 2009).

Les isothiocyanates sont surtout connus pour leur importante activité antimicrobienne contre les micro-organismes. Ces substances chimiques d'origine naturelle apparaissent comme une alternative possible aux thérapies actuelles de traitement des maladies infectieuses à base d'antibiotiques chez l'Homme. Leur utilisation est également envisagée comme solution de rechange à la lutte chimique traditionnelle en protection des cultures. Toutefois, il existe des risques que les ITC aient des effets néfastes sur la croissance des plantes ou sur les bactéries et les champignons bénéfiques du sol (mycorhizes) (Aires *et al.*, 2009). Les isothiocyanates étant toxiques pour un large éventail de micro-organismes pathogènes ou non, présents dans le sol, ils peuvent avoir un effet de sélection sur la communauté microbienne associée à la rhizosphère des Brassicacées (Bressan *et al.*, 2009 ; Beevi *et al.*, 2009) et ainsi limiter le développement de microorganismes bénéfiques à leur croissance.

Il a été montré que les isothiocyanates sont toxiques pour la plupart des microorganismes et pas seulement ceux issus de la rhizosphère. Les champignons y sont particulièrement sensibles. Citons comme exemple l'effet inhibiteur de croissance du mycélium de *Gaeumannomyces graminis* (Angus *et al.*, 1994), *Leptosphaeria maculans* (Mithena *et al.*, 1987), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*



*graminearum* ou *Bipolaris sorokiniana* (Sarwar *et al.*, 1998). D'autres ont rapporté l'effet d'isothiocyanates sur la germination de *Botrytis cinerea* (Dawson *et al.*, 1993) et *Glomus mosseae* (Vierheilig *et al.*, 1990), ou les spores et sporanges de *Peronospora parasitica* (Greenhalgh *et al.*, 1976). La toxicité semble par ailleurs liée à la propriété volatile des produits de l'hydrolyse des glucosinolates. En outre l'efficacité des isothiocyanates n'est pas homogène suivant les catégories, certains sont fongitoxiques provoquant la mort du champignon alors que d'autres ne sont que fongistatiques empêchant seulement la croissance mycélienne. Ainsi l'ampleur de la toxicité varie en fonction des isolats traités et de la nature de l'ITC en présence. Les ITC aromatiques sont plus toxiques que les aliphatiques quand ils sont incorporés à des milieux gélosés mais leur activité est plus faible sous forme volatile à cause de leur instabilité. L'efficacité de ces composés dépend également du stade de croissance des champignons, les spores sont par exemple, moins sensibles que les tubes germinatifs (Smolinska *et al.*, 2002).

Au cours de cette étude, les principaux ITC qui vont être utilisés sont les allyl-isothiocyanate (Al-ITC) et les Benzyl-isothiocyanate (Bz-ITC) (**Figure 7**). Ce sont tous deux des composés volatiles au fort pouvoir antimicrobien avec toutefois quelques différences. Les Bz-ITC sont plus efficaces que les Al-ITC sur les bactéries à Gram positif. Chez les champignons, les Al-ITC inhibent fortement la croissance d'*Aspergillus sojae* ou *Penicillium expansum* alors que les Bz-ITC n'ont qu'un effet légèrement fongistatique (Kamii et Isshiki, 2009). Cet article montre également comment ils peuvent être utilisés dans l'industrie agroalimentaire au Japon pour améliorer les conditions de conservation de certaines denrées.

Il est logique de supposer qu'au cours de l'évolution *A. brassicicola* ait acquis une certaine tolérance aux ITC. Cependant les travaux de thèse menés par Adnane Sellam au laboratoire PaVé (2003-2007) ont montré que plusieurs isolats sont sensibles aux ITC et ce pour des concentrations proches de celles estimées *in planta* (Sellam *et al.*, 2007a). La germination des conidies et l'élongation des hyphes germinatives se sont avérés être les paramètres de croissance les plus sensibles aux ITC. L'établissement de la maladie de la tache noire dépend étroitement de ces deux étapes précoces de l'infection. Cependant l'effet des ITC est très variable selon les isolats testés. Ainsi, les EC<sub>50</sub> des Al-ITC, qui correspond à la concentration d'antifongique nécessaire pour inhiber 50% de la croissance d'un champignon, varie de 0,8 mM pour la souche *Abra 12Ro* à 8,5 mM pour *Abra3* (Sellam *et al.*, 2007a).

## 2.6. Le déterminisme du pouvoir pathogène

Pour proposer des moyens de lutte contre *A. brassicicola* efficaces et durables, conformes avec une éthique écologique, il est nécessaire de connaître les facteurs et mécanismes qui régissent son pouvoir pathogène et permettent au parasite d'effectuer avec succès son cycle infectieux. Ces **déterminants du pouvoir pathogène** peuvent être répartis en deux catégories selon leurs implications dans l'interaction. La première correspond aux déterminants spécifiques d'*A. brassicicola* qui lui permettent d'envahir son hôte et de s'en nourrir. Ils sont nommés dans cette étude les facteurs nécrotiques. La deuxième catégorie développée dans la sous-partie « *facteurs de protections fongiques contre les défenses chimiques de l'hôte* », rassemble les mécanismes de contournement dépendants des défenses de la plante hôtes. Ils ont probablement été acquis par le champignon au cours d'une coévolution entre les deux organismes.

- Les enzymes lytiques

En premier lieu, les champignons pathogènes se heurtent pour leur pénétration dans les tissus hôtes aux barrières physiques de la plante. Il s'agit principalement de la cuticule qui constitue une barrière naturelle. *A. brassicicola* peut profiter des ouvertures naturelles (stomates ou blessures) pour envahir les tissus végétaux. Une autre stratégie consiste à pénétrer grâce à la production d'**enzymes lytiques** (Walton, 1994 ; Idnurm et Howlett, 2001). Ces enzymes correspondent souvent à des pectinases, des cutinases, des cellulases, des xylanases, des phospholipases et des protéases (Walton, 1994). Leur rôle va être de dégrader les parois cellulaires et d'autres barrières comme la cuticule qui constituent une défense physique constitutive des plantes. Cependant, l'implication de ces enzymes dans la pathogénie fongique n'est pas évidente à établir, puisque la plupart de ces enzymes sont codées par des familles multigéniques (Lebeda *et al.*, 2001). L'inactivation d'un gène est alors souvent sans effet sur le pouvoir pathogène du champignon, conséquence d'une redondance fonctionnelle. Comme c'est le cas de plusieurs champignons phytopathogènes (Knogge, 1996), *A. brassicicola* semble produire un mélange de plusieurs enzymes lytiques (cutinases et lipases) afin de franchir les barrières physiques des tissus des plantes hôtes. Le rôle de plusieurs lipases de type sérine estérase dans la pénétration et/ou l'adhésion d'*A. brassicicola* a été clairement établi. Certaines sont détectées précocement au niveau du site d'infection dès le contact des conidies avec les tissus hôtes, et l'addition d'anticorps anti-lipase ou d'un inhibiteur chimique de l'activité sérine hydrolase a pour effet de réduire considérablement l'apparition des symptômes (Berto *et al.*, 1997, 1999). Deux isoformes de cutinases codées par un seul gène (*CUTAB1*) ont également été identifiées (Yao et Köller, 1994). La disruption de ce gène n'a cependant aucune influence sur le pouvoir pathogène, mais a des effets drastiques sur la capacité du champignon à

utiliser la cutine comme source carbonée lors de sa croissance saprophytique (Yao et Köller, 1995; Fan et Köller, 1998). La pénétration d'*A. brassicicola* semble être notamment régulée par une voie de signalisation dépendante d'une MAP kinase codée par le gène *amk1*, homologue de *Fus3/Kss1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Le mutant d'*A. brassicicola* disrupté dans le gène *amk1* se révèle incapable de provoquer des symptômes sur plante intacte (Cho *et al.*, 2007). Cependant, l'ajout de nutriments exogènes lors de l'inoculation ou la blessure des feuilles permet le développement de la maladie. Ces résultats suggèrent que la sécrétion d'enzymes lytique est soumise d'une part à une voie de signalisation dépendante de l'AMK1 MAP kinase et d'autre part à une voie de signalisation inconnue liée aux besoins nutritifs du champignon.

- Les toxines

Le genre *Alternaria* renferme une dizaine d'espèces pathogènes productrices de HST (Host-Specific Toxins), ce qui leur confère un spectre d'hôte distinct et restreint (Otani *et al.*, 1995 ; Akamatsu *et al.*, 1999). Peu de données sont disponibles concernant les toxines d'*A. brassicicola*. La toxine AB est la seule toxine HST caractérisée jusqu'à présent (Otani *et al.*, 1998). Cette toxine est produite uniquement au niveau du site d'infection, son activité est sensible à des traitements par la chaleur et par la protéinase K (Otani *et al.*, 1998). Des études plus récentes ont démontré que la production de la toxine AB est induite par des oligosaccharides provenant de la dégradation des tissus des plantes hôtes (Oka *et al.*, 2005). Cependant les gènes impliqués dans la biosynthèse de cette toxine n'ont jamais été caractérisés jusqu'à maintenant. Plus récemment, Pedras *et al.* (2009) font état d'une phytotoxine qui semble être la HST majeure d'*A. brassicicola* : la Brassicocolin A. Responsable de la chlorose et la nécrose des tissus végétaux, elle apparaît comme la plus phytotoxique autant pour les *Brassicacées* sensibles à l'alternariose comme *B. juncea* que les plus tolérantes comme *B. napus*. L'étude de sa structure révèle que ce serait un isocyanide, dérivée du mannitol entièrement acétylé associé à plusieurs groupements chimiques (Gloer *et al.*, 1988).

- Les facteurs de protections fongiques contre les défenses chimiques de l'hôte

Pour se protéger des métabolites antimicrobiens auxquels ils sont confrontés lors de l'interaction, les champignons phytopathogènes peuvent avoir recours à différents **mécanismes de protection**.

- ✓ Mécanismes de détoxification de type dégradateur

Le substrat toxique peut être dégradé par l'intermédiaire d'enzymes en produits moins toxiques et tolérables par le champignon. Cramer et Lawrence (2004) ont identifié un gène codant une cyanide hydratase différentiellement exprimé au cours de l'interaction avec *A. thaliana*. Ces auteurs ont suggéré que ce gène pourrait être impliqué dans la détoxification des produits de dégradation des glucosinolates. Le mutant nul de ce gène montre une forte sensibilité vis à vis du produit cyanogène KCN. Il conserve cependant son agressivité, suggérant que ce gène n'est pas indispensable pour réussir la colonisation des plantes hôtes (Cramer *et al.*, 2005). Il a été montré que plusieurs agents pathogènes sont capables de détoxifier la brassinine comme notamment *L. maculans* (Pedras *et al.*, 2008) et *A. brassicicola* (Pedras *et al.*, 2009) grâce à une oxydase spécifique l'Oxydase Brassinin (BO) qui hydrolyse la phytoalexine en un composé moins toxique. Les gènes codant ces enzymes sont induits par la brassinine et la camalexine. Ce processus protecteur facilite la colonisation des plantes hôtes car la brassinine est également un précurseur de la biosynthèse de plusieurs autres phytoalexines.

- ✓ Mécanismes de détoxification de type non-dégradateur

Les **principaux mécanismes de protection non dégradateurs** se traduisent par la conjugaison et/ou séquestration d'un composé toxique (Sheehan *et al.*, 2001). Les produits antimicrobiens peuvent être alors éliminés soit par un système d'efflux membranaire ou séquestration dans la vacuole. Les études réalisées jusqu'à maintenant ont montré que le système d'efflux membranaire des champignons phytopathogènes est un moyen de détoxification qui n'est pas limité aux métabolites antimicrobiens des plantes, mais à une large gamme de xénobiotiques incluant les composés toxiques de l'environnement naturel ou même les produits toxiques du métabolisme secondaire du champignon lui même (Stergiopoulos *et al.*, 2002).

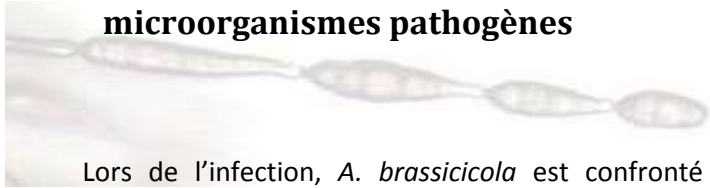
Le processus de détoxification enzymatique des xénobiotiques a été décrit comme se déroulant en trois phases distinctes mais interconnectées. Lors des phases I et II, des enzymes catalysent la conversion des xénobiotiques non-polaires en composés plus hydrosolubles et moins toxiques de manière à ce qu'ils soient éliminés plus facilement de la cellule. La phase I de détoxification est principalement le résultat de l'action du cytochrome P450 et des oxydases (Ishikawa *et al.*, 1997). Les

enzymes de la phase II catalysent la conjugaison des xénobiotiques toxiques à des composés endogènes hydrosolubles comme le glutathion réduit (GSH) ou l'uridine diphosphate (UDP)-acide glucuronique. Dans de nombreux organismes la réaction majeure de cette phase II est la conjugaison du GSH avec le composé toxique par l'action des glutathion-S-transférases (GST) (Sheehan *et al.*, 2001). Il résulte de cette réaction un composé plus soluble qui sera éliminé de la cellule au cours de la phase III du processus de détoxification. Chez les eucaryotes, le complexe est excrété activement ou compartimenté dans la vacuole par des pompes GS-X ATP dépendantes (Ernst *et al.*, 2005). Comme la fraction associée au glutathion est hydrophile, les conjugués ne peuvent généralement pas diffuser de manière passive pour réintégrer la cellule.

✓ Mécanisme compensatoire par renforcement pariétal

L'action fongitoxique des phytoalexines indoliques des *Brassicaceae*, comme la camalexine causerait des dommages au niveau de l'intégrité cellulaire (Rogers *et al.*, 1996; Sellam *et al.*, 2007). L'induction de gènes de la voie de biosynthèse de la mélanine ainsi que d'autres gènes impliqués dans la maintenance de la paroi cellulaire, lors de l'exposition d'*A. brassicicola* à la camalexine, suggère la mise en place par le champignon d'un mécanisme de protection de type «compensatoire» (Sellam *et al.*, 2007). Cette réponse adaptative se traduit par l'activation de voies métaboliques impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire par renforcement de la paroi ou/et de la membrane pour limiter la pénétration des xénobiotiques ou réparer leurs dommages. Ce mécanisme a déjà été évoqué dans le cadre du pathosystème *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* / *A. thaliana* (Rogers *et al.*, 1996). De même chez *Cryptococcus neoformans*, un mécanisme similaire est décrit en réponse à l'amphotéricine B. Le champignon va accroître sa production de mélanine afin de renforcer sa paroi cellulaire (Wang *et al.*, 1994). Plus récemment Joubert *et al.* (2010a et b) ont confirmé qu'*A. brassicicola* est capable, *in planta*, de tolérer la charge fongitoxique de la brassinine ou de la camalexine notamment par la mise en place d'un mécanisme compensatoire. Leurs résultats montrent que les voies de signalisation de l'intégrité cellulaire (CWI), de l'osmolarité (HOG) et de l'Unfolded Protein Response (UPR) ont un rôle central dans ce mécanisme de renforcement pariétal.

### 3. Le stress oxydatif comme mécanisme de défense contre les microorganismes pathogènes



Lors de l'infection, *A. brassicicola* est confronté à la présence de nombreux composés fongitoxiques qui ont des conséquences très diverses sur la biologie de l'agent pathogène. Les ITC provoquent ainsi un stress oxydatif interne via les mitochondries. Cependant ils ne sont pas la seule source de ce type de stress lors de l'interaction. Le choc oxydant est reconnu comme étant un mécanisme de défense consensus chez de nombreux organismes et les plantes en particulier lors de stress biotiques. Son origine peut être multiple et ses effets se font ressentir autant chez la plante hôte que chez le parasite.

#### 3.1. Les formes actives d'oxygène

Parmi les mécanismes de défense des plantes, la production d'un **choc oxydant** (ou "*burst*" oxydatif) au point d'infection est une composante déterminante qui agit très tôt lors de l'interaction avec un parasite. Les agents chimiques à l'origine du stress oxydatif sont les FAO (ou ROS pour Réactive Oxygen Spécies) (**tableau 1**). Lors de l'établissement de la réponse à un stress biotique une forte accumulation de FAO a lieu en une ou deux phases selon le type d'interaction : compatible ou incompatible. La première phase qui est commune aux deux types d'interaction a lieu dès les premiers instants, la seconde n'est observée que lorsque l'interaction est incompatible environ 6 à 12h après détection de l'agent pathogène. Cette dernière est une des réponses les plus étudiées entre un pathogène et sa plante hôte (Torres *et al.*, 2006). Elle constitue un élément clé du phénomène d'hypersensibilité (HR) qui permet le développement d'une lésion nécrotique localisée autour du site d'infection pour isoler l'agent pathogène (Parent *et al.*, 2008).

Les principales FAO accumulées en réponse aux stress biotiques sont les ions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, et le radical hydroxyle. Ces derniers sont essentiels à la transduction du signal à l'origine de changements physiologiques majeurs, tels que l'acidification du pH intracellulaire ou encore l'activation d'enzymes de type kinases ou phospholipases.

Lors du *burst* oxydatif, la production de FAO est généralement attribuée à un complexe NADPH-oxydase (Nox) associé à la membrane plasmique (Torres *et al.*, 2005). Elle est constituée de deux protéines membranaires formant le flavocytochrome hétérodimérique, contrôlé par trois protéines régulatrices cytosoliques, qui permettent l'activation du complexe au cours d'un stress (Bokoch, 1994). L'action d'une flavoprotéine dépendante du NADH, qui oxyde ce composé réduit en présence d'un ion fer est également rapportée (Vianello *et al.*, 1990). Au cours de cette oxydation, la

flavoprotéine, initialement sous forme réduite, est convertie en une forme radicalaire capable de réagir avec l'oxygène moléculaire et de former des ions superoxydes. Les mitochondries et les chloroplastes sont également des acteurs importants. La grande variété des types de stress suppose la mobilisation de multiples mécanismes de production des FAO, parmi lesquels les amines oxydases ou les peroxydases jouent certainement un rôle important (Parent *et al.*, 2008). Le  $\cdot O_2^-$  produit est rapidement transformé soit non-enzymatiquement, soit par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ). En présence d'ions métalliques divalents ( $Fe^{2+}$ ), le  $H_2O_2$  peut être transformé par la réaction de Fenton en  $OH^\cdot$ , une molécule chimique très réactive.

Les différentes FAO produites sont impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, soit de façon directe par action de leur forte toxicité sur les agents pathogènes, soit par activation de nombreuses voies métaboliques. Les FAO et en particulier l' $H_2O_2$  inhibent la croissance microbienne, induisent l'apoptose, servent de substrat à la lignification... Ce sont des molécules signales qui, diffusant rapidement à travers les membranes, régulent de nombreux gènes de défenses : protéines chaperones, Heat Shock Proteins (HSP), enzymes antioxydantes, ascorbate peroxydase (APX), glutathione-S-transferase (GST), gènes liés à la pathogénèse (PR) via l'acide salicylique (SA) (Zago *et al.*, 2005) ou la synthèse de phytoalexines. Il en résulte que lors de l'interaction avec un agent phytopathogène, la cellule végétale infectée répond par la néosynthèse et l'accumulation de FAO afin d'induire l'expression des gènes de défenses et de provoquer un stress oxydatif chez le parasite.

Le terme de stress oxydatif est employé lorsque le contenu en FAO dépasse le seuil de tolérance de la cellule, soit par une augmentation de la production de FAO, soit par une diminution de ses capacités de défense, soit par une entrée massive de FAO ou encore l'action combinée des trois cas de figure. Cette rupture de l'équilibre redox est à l'origine de dommages au niveau des structures et des fonctions biologiques. Les conséquences biologiques du stress oxydatifs sont très variables selon la dose et le type cellulaire. Dans le cas du choc oxydatif lors de l'interaction entre un parasite et sa plante hôte, le stress est relativement important. Son impact s'étend à l'échelle cellulaire provoquant des dégâts aussi bien chez le parasite que dans la cellule végétale (**figure 8**). L'action des FAO aboutit à des lésions directes des molécules biologiques par oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**figure 9**) (Farmer et Davoine, 2007). Dans la majorité des cas, les dommages occasionnés par cet excès de FAO, s'ils ne sont pas rapidement limités, conduisent à la mort puis la lyse des cellules concernées.

Chez les champignons filamenteux l'exposition à de fortes concentrations de FAO lors de l'interaction avec une plante hôte conduit à la mort de l'organisme. Cependant **les FAO sont**

**également essentielles** à leur fonctionnement lorsque leur concentration n'atteint pas un seuil létal. Certains champignons ont, dans leur génome, des familles de gènes codant des NADPH-oxydases impliquées dans la production de FAO intracellulaires. Ces Nox fongiques sont essentielles à de nombreux processus physiologiques comme la production d'organe de reproduction sexuée chez *Aspergillus nidulans* (Lara-Ortiz *et al.*, 2003), la germination des ascospores chez *Podospora anserina* (Malagnac *et al.*, 2004) ou la croissance mycélienne lors de l'interaction plante/champignon chez *M. grisea* (Egan *et al.*, 2007).

### 3.2. Les Isothiocyanates

L'analyse du transcriptome de ce phytopathogène en présence d'ITC a permis de mettre en évidence l'induction de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif notamment les gènes du cycle du glutathion (Sellam *et al.*, 2007b). L'induction d'un stress oxydatif par les ITC chez *A. brassicicola* a par la suite été confirmée à l'aide de sondes spécifiques de la présence des FAO (**figure 10**). Ces composés de défenses des Brassicacées seraient capables de diffuser dans le milieu intracellulaire fongique et générer un stress oxydatif par le biais des mitochondries. Cette hypothèse a été depuis lors vérifiée dans des cellules pancréatiques comme le démontre les récents travaux de Brown *et al.* (2010).



## 4. Mécanismes fongiques liés à la réponse adaptative aux stress oxydatifs



Face aux FAO qu'elles soient extracellulaires lors du burst oxydatif *in planta* ou générés par les ITC au niveau intracellulaire, *A. brassicicola* doit posséder des mécanismes qui lui permettent de tolérer ces stress oxydatifs. Les réponses adaptatives peuvent intervenir directement sur les radicaux libres ou plus en amont en réduisant la charge toxique des ITC. Les polyols apparaissent dans la littérature comme étant des molécules impliquées dans la régulation de l'équilibre oxydatif cellulaire. D'autre part, les Glutathions-S-transférases sont connues pour intervenir dans la détoxification de xénobiotiques.

### 4.1. Implication du métabolisme du mannitol dans la réponse adaptative fongique

D'une manière générale, les alcools polyhydroxylés ou **polyols** sont souvent étudiés pour leurs propriétés protectrices potentielles contre divers stress. Ce sont des sucres acycliques issus du métabolisme secondaire possédant plusieurs fonctions alcools. De nombreuses fonctions physiologiques leur sont attribuées notamment comme molécule de stockage de carbone (Witteveen et Visser, 1995), source de pouvoir réducteur, régulateur de pH, osmoprotecteur (Stoop et Mooibroek, 1998) ou antioxydant (Smirnoff et Cumes, 1989; Voegele *et al.*, 2005). Ce sont des composés compatibles dont l'accumulation ne gêne en rien le bon fonctionnement de la cellule. Les polyols sont présents dans tous les organismes vivants, néanmoins les champignons sont les principaux producteurs et accumulateurs (Lewis et Smith, 1967 ; Jennings, 1984). Parmi eux le tréhalose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), le glycérol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), l'erythritol et le threitol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>), l'arabitol et le xylitol (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>), le sorbitol et le mannitol (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) sont les plus représentés.

Les sucres peuvent jouer un rôle primordial dans le mécanisme infectieux. C'est le cas par exemple du glycérol qui permet la formation d'une pression de turgescence dans les *appressoria* et est ainsi à l'origine d'une force invasive qui conduit à la formation d'hyphes capables de pénétrer la cuticule de l'hôte (De Jong *et al.*, 1997). Des mutants de *Stagonospora nodorum* qui n'expriment plus le gène *tps1* essentiel à la synthèse du tréhalose, ne sont plus capables de sporuler *in vitro* et *in planta* et leur pouvoir pathogène est par conséquent très réduit. La perte de la capacité à produire du tréhalose provoque chez ce champignon une sensibilité accrue au stress oxydatif (Lowe *et al.*, 2009). Ce phénomène est également observé chez des souches d'*A. nidulans* (Fillinger *et al.*, 2001) ou *M. grisea* et *B. cinerea* (Foster *et al.*, 2003) présentant une mutation homologue.

- Le mannitol

Le mannitol est un des composés biochimiques les plus abondants dans la biosphère (Solomon *et al.* 2004). Il peut représenter jusqu'à 15% du poids sec fongique chez les Ascomycètes et Basidiomycètes (Lewis et Smith, 1967 ; Pfyffer *et al.*, 1998). Le **mannitol (figure 11)** est rapporté dans la littérature comme étant un candidat à des fonctions de protection contre le stress oxydatif chez les champignons. Il possède notamment la propriété de neutraliser les FAO en conditions *in vitro* (Smirnoff et Cumes, 1989) ou *in vivo* (Shen *et al.*, 1997). Par exemple, une concentration de 20 mM de mannitol est suffisante pour inactiver environ 60% des radicaux hydroxylés ajoutés au milieu lors d'essais *in vitro* (Smirnoff et Cumes, 1989). Chez *A. niger* l'inactivation du gène codant une enzyme de la voie de synthèse du mannitol induit une sensibilité à plusieurs stress dont le stress oxydatif. L'ajout de mannitol dans le milieu rétablit la tolérance au NaOCl qui génère des ions hyperoxydes, composés au fort pouvoir oxydant (Ruijter *et al.*, 2003). Stoop et Mooibroek (1998) ont également suggéré un rôle possible du mannitol dans l'adaptation fongique au stress osmotique chez *Agaricus bisporus*. Ce polyol interviendrait également dans les mécanismes de tolérance à des stress thermiques notamment au niveau des conidies d'*A. niger* (Ruijter *et al.*, 2003). Lors de l'étude du métabolisme du mannitol, le gène codant une mannitol dehydrogenase chez *C. neoformans* nommée *Mt1* a été exprimé de manière hétérologue chez la levure *S. cerevisiae*. A l'état sauvage la levure ne produit pas de mannitol, ne l'assimile et l'accumule que faiblement (Quain et Boulton, 1986). Le mutant de *S. cerevisiae* exprimant le gène *mt1* est quand à lui capable de le synthétiser (Perfect *et al.*, 1996). L'expression du gène *mt1* a également été obtenue chez des levures mutantes osmosensibles (mutées dans le gène *osg1-1* impliqué dans la synthèse du glycérol). La capacité de ces mutants à produire du mannitol restaure leur tolérance au stress salin provoqué par de hautes concentrations en NaCl dans le milieu de culture. Ce génotype est également capable de survivre à des doses normalement létales d' $H_2O_2$ ,  $FeSO_4$  ou NaCl qui sont des agents oxydants (Chaturvedi *et al.*, 1996). Le mannitol semble donc être impliqué dans la protection contre les stress oxydatifs et partage des fonctions osmoprotectrices avec le glycérol.

- Le métabolisme du mannitol

Le **métabolisme du mannitol** a été initialement décrit chez *Alternaria alternata*, pathogène du tabac par Hult et Gatenbeck (1978, 1980) puis par Véléz *et al.* en 2006 (**figure 12**). Le composé précurseur du mannitol est le glucose qui doit d'abord être transformé en glucose-6-phosphate (G6P) puis fructose-6-phosphate (F6P). Le mannitol peut alors être synthétisé à partir du F6P via deux voies indépendantes (Solomon *et al.*, 2006 ; Véléz *et al.*, 2006). D'une part le F6P peut être réduit en mannitol-1-phosphate (M1P) par la mannitol-1-phosphate dehydrogénase (MPD) (réaction réversible

qui nécessite l'oxydation d' $\text{NADH}/\text{H}^+$ ), puis le M1P est déphosphorylé par une phosphatase (MPP) en mannitol (réaction irréversible). D'autre part le F6P peut être converti via une hexokinase (HXK) en fructose qui est transformé en mannitol par la mannitol déhydrogénase (MDH) (réaction qui nécessite la consommation de  $\text{NADP}^+$ ). Cette voie de biosynthèse via le fructose est réversible permettant la génération de pouvoir réducteur. Pour chacune des voies, les différentes études menées se focalisent sur deux enzymes particulière : la **mannitol déhydrogénase (MDH)** et la **mannitol-1-phosphate déhydrogénase (MPD)** (Figure). Ces enzymes sont les cibles de régulation de la voie de biosynthèse. La MPD semble être régulée rétro-négativement par le mannitol suivant le modèle décrit chez *Aspergillus candidus* (Strandberg, 1969) et *Sphaerospora brunnea* (Ramstedt *et al.*, 1987). Le gène qui code la mannitol-1-phosphate déhydrogénase est retrouvé dans la littérature sous plusieurs nomenclatures : *mt1*, *mpdh* ou *mpd*. De même le gène codant la mannitol déhydrogénase est nommé *mtd*, *mtdh* ou *mdh*. Dans la présente thèse ils seront respectivement nommés *mpd* et *mdh*.

Des mutants disruptés incapables de produire ces deux enzymes ne synthétisent pas de mannitol chez *A. alternata*, suggérant qu'il n'existe aucune autre voie de synthèse. Le mutant nul du gène *mpd* est également fortement altéré dans sa capacité à produire ce polyol alors que l'impact est moindre chez le mutant  $\Delta mdh$  (Véléz *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que la MPD est responsable de la synthèse de la majorité du mannitol produit par ce champignon, ce qui est appuyé par d'autres travaux chez *A. niger* (Ruijter *et al.* (2003) et *S. nodorum* (Solomon *et al.*, 2005). Cependant le mutant  $\Delta mdh$  et à fortiori le double mutant  $\Delta mpd\Delta mdh$  sont capables de se développer sur des milieux ayant le mannitol comme unique source de carbone. La voie MPD dépendante étant décrite comme strictement productrice de mannitol, cela suggère l'existence d'enzyme non décrite pouvant utiliser le mannitol comme substrat.

- Implication du mannitol dans le déterminisme du pouvoir pathogène

Plusieurs travaux semblent confirmer l'importance du mannitol dans le **déterminisme du pouvoir pathogène**. Jennings *et al.* (1998) ont mis en évidence que la production et la sécrétion de mannitol sont fortement induites chez *A. alternata* en présence d'extraits de feuille de tabac. De plus, l'infection par ce pathogène induit l'expression du gène codant la MDH chez le tabac, bien que cette plante ne produise pas de mannitol. Les auteurs suggèrent d'ailleurs qu'une MDH végétale pourrait jouer un rôle de protéine PR (pathogenesis-related) en catabolisant le mannitol fongique, laissant ainsi le champignon sans défense contre les FAO. Cette hypothèse a été renforcée par l'expression constitutive d'une MDH hétérologue (provenant du céleri) chez le tabac (Jennings *et al.*,

2002). Cette expression hétérologue se traduit par une résistance accrue des plantes hôtes à *A. alternata* capable de produire et sécréter du mannitol. Aucune résistance au champignon pathogène *Cercospora nicotianae*, non sécréteur de mannitol, n'est par contre observée. L'expression hétérologue dans le tabac d'un transporteur de mannitol AgMaT2 de céleri diminue la sensibilité de la plante à ce pathogène. Le transporteur hétérologue pourrait prélever le mannitol de la zone d'interaction privant ainsi le champignon d'un composé nécessaire à sa protection contre les FAO (Juchaux-Cachau M *et al.*, 2007). Le rôle du mannitol dans le processus infectieux a aussi été suggérée dans le cadre d'une interaction biotrophe entre le champignon *Uromyces fabae* et la fève (*Vicia faba*) (Voegele *et al.*, 2005). Le mannitol s'accumule de manière considérable dans les feuilles infectées, ce qui s'accompagne d'une induction de l'expression de la MDH fongique.

D'autre part, des travaux récents effectués chez le pathogène du blé *S. nodorum* indiquent que le mannitol est nécessaire à la sporulation asexuée du champignon (Solomon *et al.*, 2005, 2006). *S. nodorum* appartient à la classe des Dothideomycètes et est donc phylogénétiquement proche d'*A. brassicicola*. Des doubles mutants nuls pour les gènes *mpd* et *mdh* ont été obtenus. Ceux-ci sont incapables de croître sur des milieux contenant du mannitol comme seule source de carbone et ne synthétisent plus que de faibles quantités de ce polyol. Ils perdent également leur capacité à sporuler en conditions *in vitro* mais aussi *in planta*. Ce mécanisme de sporulation peut néanmoins être restauré en partie par ajout de mannitol. Les mutants ne sont nullement affectés dans leur capacité d'infection puisqu'ils forment des nécroses caractéristiques sur feuilles. Il apparaît probable cependant que l'absence de sporulation *in planta* ait un impact majeur sur la dissémination du champignon au cours de son cycle infectieux et réduise ainsi très fortement son pouvoir pathogène.

Récemment, des travaux conduits sur *B. cinerea* placent le mannitol au centre de la compétition entre le champignon et la plante hôte pour l'acquisition de ressource carbonée (Dulermo *et al.*, 2009). Un dosage des sucres solubles présents dans les feuilles infectées a révélé une augmentation progressive du mannitol alors que la plante n'est pas capable de le métaboliser. Les auteurs avancent l'hypothèse que le champignon remobilise les hexoses végétaux en mannitol. Ainsi transformé, le mannitol fongique devient une ressource carbonée non utilisable par la plante. La suite de leurs travaux semble attribuer à ce polyol une fonction de composé de stockage qui serait remobilisé lors du développement du champignon ou en réponse à divers stress. Il serait alors métabolisé en glucose ou fructose. Ces travaux suggèrent en outre une nouvelle voie de phosphorylation du mannitol en mannitol-1-phosphate inconnue jusqu'alors (Dulermo *et al.*, 2010).

L'implication du mannitol dans le déterminisme du pouvoir pathogène et ses propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo* (Jennings *et al.*, 1998) ont conduit à l'élaboration d'un modèle

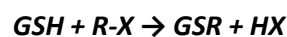
hypothétique sur le rôle du mannitol fongique dans la protection contre le stress oxydatif généré lors de l'interaction avec la plante hôte.

#### 4.2. Rôle du cycle du glutathion dans les mécanismes de protection

Le rôle protecteur des GST est en grande partie dépendant du **cycle du glutathion** ( $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine ou GSH) (**figure 13**). C'est un tripeptide à cystéine dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Le glutathion est présent en grande quantité dans les cellules eucaryotes (Penninckx, 2000). Sa biosynthèse est réalisée par des étapes de condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine en présence d'ATP (May *et al.*, 1998). En situation de stress oxydatif, son rôle protecteur et d'agent de détoxification résulte principalement de sa fonction de coenzyme des glutathion peroxydases et des glutathion-S-transférases comme décrit ci-dessous. Il peut également directement réagir chimiquement avec les FAO et jouer un rôle direct de quencher. Le glutathion intervient dans la stabilisation des structures membranaires en éliminant les peroxydes formés au cours de la peroxydation des lipides (Price *et al.*, 1990). Enfin, il fait l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants de protection antioxydante, tels que l'ascorbate et l' $\alpha$ -tocophérol (Ramel, 2009).

- Rôles des Glutathion-S-Transférases (*GST*)

Les enzymes de la famille des GST ont la caractéristique de posséder une large gamme de substrats potentiels avec une faible affinité pour ceux-ci (valeur de  $K_m$  élevée). Elles assurent ainsi la conjugaison du glutathion à une très large gamme de composés. Un pouvoir catalytique de faible efficacité ( $V_{max}/K_m$ ) est caractéristique de la flexibilité fonctionnelle et a probablement fait partie intégrante de l'évolution des GST permettant la détoxification d'un large éventail de produits chimiques endogènes et environnementaux (Tew-Ronai, 1999). Cette réaction avec un substrat électrophile peut être schématisée comme suit :



La conformation des GST permet un rapprochement étroit entre le GSH et le substrat électrophile de manière à ce que s'effectue une attaque nucléophile qui va lier le groupe sulfhydryle du GSH sur le substrat.

La variété des composés électrophiles (présenté comme *R-X* dans l'équation ci-dessus) qui peuvent être conjugués au glutathion par les GST comprend des composés halogénés aliphatiques et aromatiques, les peroxydes et les époxydes,  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturés et des protéines de faible poids

moléculaire. Elles sont également capables de conjuguer le GSH aux ITC. Cette propriété a été démontrée chez *A. thaliana*, pour protéger les cellules végétales de la toxicité des ITC (Bednarek *et al.*, 2009), mais également chez les champignons notamment chez *A. brassicicola* (Sellam *et al.*, 2006). En plus de la conjugaison des électrophiles au GSH et la réduction du peroxyde. Il résulte de cette dernière réaction, la formation de glutathions oxydés et conjugués deux à deux (GSSG). Les GST sont également capable de catalyser plusieurs autres types de réaction comme notamment des substitutions de cétone aromatique ou des ouvertures de cycle par époxydation.

Les GST ont été régulièrement rapportées comme étant associées à d'autres processus biologiques importants sans rapport avec des mécanismes protecteurs. Certaines GST sont impliquées dans la modulation des canaux ioniques (Dulhunty *et al.*, 2001) ou des canaux calciques dans le réticulum endoplasmique des cellules musculaires humaines (Dulhunty *et al.*, 2001). Chez le maïs, une GST codée par le gène *bz2* catalyse la conjugaison du GSH au cyanidine 3-glucoside, effectuant ainsi la dernière étape de la biosynthèse des pigments anthocyanes (Marrs *et al.*, 1995). D'autres GST sont impliquées dans le catabolisme de la phénylalanine/tyrosine, en catalysant l'isomérisation du maléylacétoacétate en fumarylacétoacétate (Fernandez-Canon et Penalva, 1998).

Certaines possèdent également une fonction non catalytique de liaison. Elles piègent par interaction hydrophobe des ligands aromatiques, tels que les dianthraquinones, chez les mammifères. La liaison des stéroïdes, hèmes, ou autres ligands de cette manière, peut modifier la distribution tissulaire des GST (Lu & Atkins, 2004). Cependant cette fonction ne semble liée à aucun mécanisme de détoxication. Enfin à titre informatif, quelques études attribuent à certaines GST particulières **un rôle dans la régulation** de plusieurs enzymes et facteurs de transcriptions par des interactions non-catalytiques protéine-protéine. Deux exemples sont notamment remarquables. Il s'agit tout d'abord de l'inhibition d'une MAP-kinase, c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) qui intervient dans la régulation de l'apoptose par une interaction protéine: protéine avec ASK1 (apoptosis signal de régulation kinase) catalysée par la GST codée par le gène *p1-1* chez l'Homme (Townsend *et al.*, 2003). Il s'agit par ailleurs de, l'inhibition par une GST (codée par le gène *ure2*), de facteurs transcriptions de type GATA qui jouent un rôle clef dans la répression catabolique de l'azote chez la levure *S. cerevisiae*. Le rôle régulateur des GST est stipulé comme étant une fonction conservée au cours de l'évolution (Todorova, 2007).

Historiquement, les GST ont été en premier lieu découvertes dans les tissus des mammifères au début des années 60. Elles sont regroupées en superfamille dont le nombre de classe est sans cesse croissant. Avec le développement de l'analyse bioinformatique et le séquençage de génomes entiers, de nombreuses nouvelles GST ont été identifiées sur la base de motifs

caractéristiques (Vuilleumier & Pagni, 2002). Bien qu'il n'existe pas de critères clairement établis concernant la mesure de similarité de séquence requise pour placer une GST dans une classe particulière, il est généralement admis que l'identité doit être supérieure à 60% avec la GST de référence pour être répertoriée dans une classe (Sheehan *et al.*, 2001). La séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale est prépondérante pour le classement car elle comprend le plus souvent le site actif de l'enzyme et de ce fait, cette région a tendance à être mieux conservée. Selon une étude menée essentiellement sur des modèles mammifères, trois sous-familles de GST sont généralement admises, chacune étant codée par des familles multigéniques distinctes : la première étant les GST solubles ou cytosoliques, la seconde, les GST microsomaux (MAPEG). Ce sont des protéines membranaires associées au métabolisme du glutathion notamment (Hayes *et al.*, 2005). Chez les procaryotes, plusieurs études décrivent des GST bactériennes comme des GST plasmidiques impliquées dans la résistance au fosfomycine (Suarez *et Mendoza*, 1991). Cependant un nombre important de GST potentielles identifiées par bioinformatique n'était pas encore classées. Certaines forment des groupes séparés très différents des trois classes existantes en fonction de leur structure et de leur éloignement phylogénétique comme par exemple les GST de la famille Kappa (Frova, 2006). Les GST fongiques s'intègrent difficilement dans l'une de ces trois classes déjà caractérisées. Elles présentent une grande diversité dans leur séquence en acides aminés qui souvent est éloignée des GST étudiées chez les mammifères. Une étude recense 77 protéines appartenant à la famille des GST décrites chez 21 espèces de champignons et les regroupe en six classes principales : *Clusters 1* et *2*, *EF1By*, *Ure2p*, *MAK16* et *gamma* (McGoldrick *et al.*, 2005). Ces groupes sont très différents de ceux déjà définis chez les eucaryotes dits supérieurs, ne serait-ce que par leur important éloignement phylogénétique.

Le *cluster 1* est notamment constitué de deux sous-ensembles non-monophylétiques où sont respectivement classées la *GST3* caractérisée chez *S. pombe* (Veal *et al.*, 2002) ou *GTT1* chez *S. cerevisiae* (Mariani *et al.*, 2008) impliquées toutes les deux dans la tolérance au stress oxydatif et la détoxification de molécules toxiques. Le *Cluster 2* proche phylogénétiquement du *Cluster 1*, regroupe notamment *GSTA* caractérisée chez *A. nidulans* qui joue un rôle dans la résistance à divers xénobiotiques ou la tolérance aux métaux lourds (Fraser *et al.*, 2002). Une nouvelle classe de GST nommée *gamma*, a été mise en évidence en 2002 par Cha *et al.* à partir de l'analyse de séquences de *C. elegans*. Les *GSTG1-1* et *GST1-2* qui la compose sont supposées avoir un rôle dans les mécanismes de détoxification. Cette classe apparait comme clairement distincte des principales classes de GST décrites. Peu de GST fongiques parmi celles analysées par McGoldrick *et al.* (2005) sont associées à cette classe *gamma*. Les GST de type *MAK 16* dont la fonction précise est encore méconnue sont associées à la réponse adaptative contre les stress oxydatifs (McGoldrick *et al.*, 2005). Les récentes

disponibilités de nombreuses séquences génomiques a permis un important développement de la classification des GST notamment appartenant au règne fongique. Une nouvelle classe, GTE, a été identifiée qui renferme des GST possédant une activité  $\beta$ -etherase pouvant avoir un rôle dans la dégradation de composés organiques notamment du bois ou dans l'oxydation de xénobiotiques (Morel *et al.*, 2009). Des GST comme Gtt2 de *S. cerevisiae* forment une classe atypique puisque l'absence des résidus catalytiques essentiels consensus la distingue des autres GST cytosoliques (Ma *et al.*, 2009).

Les gènes codant les GST peuvent être exprimés constitutivement mais également induits par de nombreux composés. Néanmoins, la régulation des GST par les xénobiotiques est généralement la conséquence de modification post-transcriptionnelle (Eaton et Bammler, 1999). Chez la levure, la région promotrice du gène *GTT1* contient des régions spécifiques de la réponse aux xénobiotiques (Choi *et al.*, 1998). Elle contient également plusieurs copies de la région consensus de réponse aux stress (STRE), ainsi que le site de fixation du facteur de transcription Yap1 connu pour moduler la réponse adaptative aux stress oxydatifs ou aux agents cytotoxiques. Cette régulation des GST semble être répandue comme le suggère cet exemple chez *S. pombe* où des gènes codant des GST sont sous l'influence du facteur de transcription Pap1, Homologue de Yap1 (Kim *et al.*, 2004). La transcription de *GTT1* est également induite par un stress osmotique ou en présence de xénobiotiques. Les gènes codants les premières GST identifiées chez *A. fumigatus* sont surexprimés en présence d' $H_2O_2$  et de CDNB suggérant un rôle pour ces enzymes dans la réponse adaptative aux stress oxydatifs et la tolérance aux xénobiotiques (Burns *et al.*, 2005). Le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene ou CDNB est le substrat de référence qui est couramment utilisé pour mesurer l'activité de conjugaison du glutathion à un composé électrophile par une GST.

Il se trouve également que certaines GST jouent un rôle direct dans la réponse antioxydante grâce à leur fonction glutathion peroxydase (GPx) qui permet de réduire efficacement les peroxydes d'hydrogène endogènes ou exogènes ou éliminer les peroxydes d'acides gras (Awasthi *et al.*, 2004 ; Bai *et al.*, 2004). Chez *S. pombe* trois gènes codant des GST sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif, leur expression est induite par l' $H_2O_2$  et ils sont nécessaires pour la à ce type de stress. Les trois protéines présentent une activité de conjugaison du glutathion au CDNB mais une seule d'entre elles présente une activité peroxydase (Veal *et al.*, 2002).

Leur propriété de complexer différents xénobiotiques au glutathion font des GST des candidats sérieux dans la **protection contre les ITC**. Cette idée est renforcée par les travaux de Zhang *et al.* (1995) qui mettent en évidence la conjugaison du glutathion aux ITC par des GST caractérisée chez l'Homme. Des résultats similaires ont mis en évidence que l'insectes *Myzus persicae* parasite des



*Brassicacées* tolèrent les produits de dégradation des glucosinolates notamment grâce à des GST (Francis *et al.*, 2005). Récemment chez *C. elegans* il a été démontré que les ITC induisaient spécifiquement les GST (Hasegawa *et al.*, 2010) ; ces auteurs ont montré que cette induction confère à *C. elegans* une tolérance vis à vis des stress oxydatifs. Dans un autre pathosystème, *Sclerotinia sclerotiorum* / *Brassica napus*, l'induction chez le pathogène de gènes codant des GST et l'augmentation de leur activité *in planta* et en présence d'ITC confortent l'hypothèse que les GST jouent un rôle dans les mécanismes de détoxication des ITC contribuant à la tolérance des champignons pathogènes des *Brassicacées* aux dérivés des glucosinolates (Rahmanpour *et al.*, 2009). Chez *A. brassicicola*, les résultats obtenus par Sellam *et al.* (2007a) ont montré que six gènes codant des GST étaient surexprimés lors de l'exposition aux ITC. L'une de ces GST, AbGST1, qui est également surexprimée lors de l'interaction avec la plante hôte, a plus particulièrement été étudiée. L'expression de la protéine recombinante chez *E. coli* a mis en évidence que les ITC constituent des substrats privilégiés de cette GST (Sellam *et al.*, 2006). De plus les bactéries surexprimant AbGST1 montrent une tolérance particulière à ces composés (Sellam, 2007). Les gènes codant des GST font souvent partie d'une famille multigénique. Il est ainsi probable qu'*A. brassicicola* possède plusieurs GST impliquées dans le déterminisme du pouvoir pathogène via la détoxication des xénobiotiques et notamment des ITC.

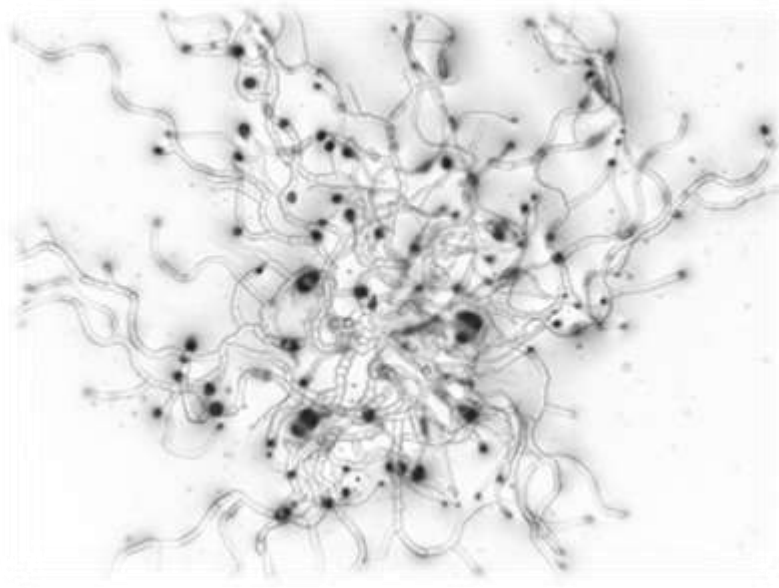
## Problématique

Les mécanismes qui régissent le pouvoir pathogène des champignons font l'objet d'études innovantes. Peu d'entre elles se focalisent cependant sur les stratégies de contournement des défenses de l'hôte. Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse ont pour objectif de contribuer à leur compréhension dans un pathosystème modèle de l'interaction nécrotrophe : Brassicacées / *A. brassicicola*. Cette famille de plante, qui présente un intérêt agronomique, a développé au cours de l'évolution une tolérance à certains stress biotiques. Elle est en partie due au pouvoir antimicrobien de certains métabolites secondaires ou leurs dérivés. Parmi ce panel de défenses chimiques spécifiques aux Brassicacées, une catégorie a été particulièrement étudiée au cours de ces travaux de thèse : il s'agit des ITC issus de la dégradation des phytoanticipines glucosinolates. Le mode d'action des ITC conduit à l'induction d'un stress oxydatif chez le parasite. Malgré ces défenses chimiques, *A. brassicicola* est toujours capable de réaliser son cycle infectieux, indiquant que le champignon possède des mécanismes de protection contre la toxicité cellulaire générée par les ITC. Cette étude se focalise principalement sur la caractérisation des moyens fongiques mis en place pour tolérer les dommages causés par les ITC lors de l'interaction.

Dans un premier temps, les recherches ont été axées sur les mécanismes de protection potentiellement mis en place par ce champignon pour tolérer les formes actives d'oxygène. L'accumulation de mannitol fongique dans des feuilles infectées et ses propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo*, ont conduit à l'élaboration d'un modèle hypothétique sur le rôle du mannitol fongique dans la protection contre les FAO. L'étude du métabolisme du mannitol menée dans le chapitre 1 de ce manuscrit analyse l'importance de ce polyol dans le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* et notamment dans la tolérance au stress oxydatif généré par les ITC.

Une approche plus ciblée sur la diminution spécifique de la charge fongitoxique des ITC a ensuite été abordée. Les GST sont connues pour jouer un rôle important dans la détoxification de ce type de molécules en les conjuguant au glutathion. Le complexe, moins toxique que la molécule libre, peut être séquestré dans la vacuole ou exporté vers le milieu extérieur. Chez *A. brassicicola*, six GST ont été sélectionnées en fonction de leur surexpression relative *in planta* et en présence d'ITC. Les propriétés de conjugaison des ITC au glutathion par l'une d'entre elles (AbGST1) avaient été caractérisées au préalable dans un modèle hétérologue. Dans le chapitre 2, les cinq autres GST sélectionnées ont été caractérisées et leur implication respective dans la tolérance aux ITC et le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* a été évaluée.

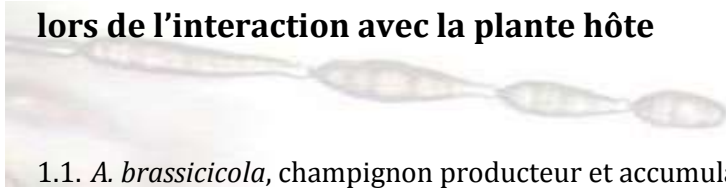
# Chapitre 1 : Etude du rôle du mannitol dans la protection contre les stress oxydatifs et dans l'expression du pouvoir pathogène d'*A. brassicicola*



## Chapitre 1 : Etude du rôle du mannitol dans la protection contre les stress oxydatifs et dans l'expression du pouvoir pathogène d'*A. brassicicola*

Voegele *et al.* en 2005 et plus récemment Dulermo *et al.* en 2010 ont mis en évidence une accumulation de mannitol dans les feuilles infectées de différents pathosystèmes fongiques. Jennings *et al.* (1998) avaient précédemment démontré les propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo* de cette molécule. Lorsque une plante est infectée par un pathogène, des réactions de défense sont induites, notamment la production de FAO au niveau du site d'infection. Quand cette plante hôte appartient à la famille des Brassicacées, le stress oxydatif peut également être généré dans les cellules du parasite par l'action des ITC (Sellam *et al.*, 2006). L'hypothèse de travail testée ici propose que lors de l'interaction avec son hôte, *A. brassicicola* pourrait accumuler du mannitol pour se protéger du stress oxydatif intracellulaire et potentiellement le sécréter pour se protéger du stress oxydatif extracellulaire (**figure 14**). L'étude du rôle du mannitol dans la protection contre les stress oxydatifs et dans l'expression du pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* va se décomposer en deux sous-chapitre. Le premier se focalisera sur la caractérisation du métabolisme du mannitol et son implication dans la physiologie du champignon. Le deuxième a pour objectif d'identifier un transporteur de mannitol afin de mesurer l'importance de la sécrétion de ce polyol notamment lors de l'interaction avec la plante hôte.

## 1. Chapitre 1.a : Rôle du mannitol produit et accumulé par *A. brassicicola* lors de l'interaction avec la plante hôte



### 1.1. *A. brassicicola*, champignon producteur et accumulateur de mannitol

L'hypothèse proposée suppose que le modèle étudié est producteur de mannitol. Pour vérifier ce premier postulat, les sucres solubles contenus dans le mycélium d'*A. brassicicola* ont été dosés par HPLC *in vitro* et *in planta*.

La quantité des sucres solubles a été évaluée à plusieurs stades de développement d'*A. brassicicola* comprenant les conidies seules, une phase précoce du développement des hyphes (24h, milieu synthétique Vogel + 2% glucose, 150 rpm, 24°C) et une phase tardive de la croissance correspondant à un mycélium mature différenciant des conidies (7 jours, milieu synthétique Vogel + 2% glucose, 150 rpm, 24°C). Nous nous sommes uniquement focalisé sur le mannitol et le tréhalose dont l'implication dans les mécanismes fongiques de protection contre les stress est souvent citée (**figure 15**). *A. brassicicola*, comme *A. Alternata* (Vélèz *et al.*, 2006) produit et accumule du mannitol de manière constitutive. Dans les conidies, le mannitol et le tréhalose sont les deux principaux sucres accumulés et ils le sont en proportion équivalente. Dans les jeunes hyphes, 24h après la germination des spores, les deux sucres sont également présents à des concentrations proches mais plus élevées que dans les conidies. A l'issue de temps de culture plus long, les quantités mesurées pour ces deux molécules dans les cellules fongiques sont plus faibles par rapport à la matière sèche totale. La quantité de mannitol mesurée correspond alors au double de celle mesurée pour le tréhalose. Il faut noter qu'à ce stade de culture, le matériel fongique correspond à un mélange de mycélium et de conidies rendant difficile l'interprétation des quantités glucidiques accumulées.

Le génotype sauvage d'*A. brassicicola* a également été cultivé en milieu complexe PDB pendant sept jours (24°C, 150 rpm), en présence de 10% d'extrait de plante hôte (radis) ou non hôte (tomate). L'analyse HPLC des sucres solubles extraits du matériel fongique récolté à l'issue de ces cultures (**figure 16**) montre que l'accumulation de mannitol est significativement accrue lorsque le champignon est cultivé en présence d'extraits de plante hôte par rapport aux cultures réalisées sur du milieu PDB seul ou supplémenté d'extraits de plante non-hôte. Il faut également noter que la quantité de mannitol mesurée dans le matériel fongique après culture sur du milieu PDB est plus importante que celle mesurée sur milieu synthétique Vogel, illustrant l'influence de la composition du milieu extérieur sur la quantité de mannitol accumulé par le champignon.

Lors de l'interaction, une compétition pour les ressources carbonées est établie entre la plante et le parasite. Une des stratégies fongiques avancée par Dulermo *et al.* (2010) consisterait à détourner les sucres d'origine végétale en les transformant en mannitol non métabolisable par les plantes hôtes. Pour avoir un aperçu de ce type d'échange dans le cadre notre pathosystème, une analyse des sucres majoritaires extraits de feuilles lors d'une cinétique d'infection d'*A. brassicicola* sur chou a été effectuée (**figure 17a**). Le chou est utilisé préférentiellement au laboratoire comme plante hôte en raison de sa forte sensibilité à *A. brassicicola*. Les feuilles sur plant sont inoculées avec 5 µl d'une suspension à 10<sup>5</sup> conidies par ml et les zones symptomatiques sont prélevées pour extraction des sucres solubles. Les temps choisis pour cette cinétique correspondent à des étapes caractéristiques de l'interaction. Deux jours après inoculation, les conidies déposées sur la feuille ont commencé à germer et pénétrer la cuticule (**figure 17b**), et seul un halo chlorotique diffus est perceptible. Après quatre jours d'incubation les premiers symptômes sont bien visibles et caractérisés par un halo chlorotique autour d'une zone nécrotique présentant encore relativement peu de conidies. Le sixième jour après inoculation correspond au développement total de la maladie : le halo chlorotique et la zone nécrotique se sont élargis, la nécrose est recouverte abondamment de conidies.

Le mannitol fongique est détecté dès les premiers jours post-inoculation (2 j.p.i) et s'accumule de manière très importante lors du développement des symptômes (4 j.p.i). Cependant lorsque la nécrose est bien développée (6 j.p.i) et que le champignon est en phase de quasi saprophytisme se nourrissant alors des tissus végétaux morts, la quantité de mannitol mesurée diminue. Le saccharose présent dans les feuilles non inoculées diminue progressivement lors de l'interaction jusqu'à disparaître. Comme le mannitol, le tréhalose semble spécifique du champignon, il apparaît en quantité détectable à partir du jour 4 post-inoculation et semble augmenter au cours de la cinétique. Les quantités de glucose évolue également lors de l'interaction mais il est impossible dans ces conditions de différencier le glucose fongique du glucose végétal. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés par Dulermo *et al.* (2010).

Le mannitol chez *A. brassicicola* est présent de manière constitutive, cependant son accumulation diffère selon l'organe du champignon ou les conditions de culture. Les variations observées en présence d'extraits de plante hôte et *in planta* supposent l'existence d'éliciteurs spécifiques des *Brassicacées* qui induisent la production de mannitol chez le champignon lors de la phase infectieuse. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse de départ qui stipule une implication du polyol dans l'interaction.

## 1.2. Caractérisation de gènes des voies métaboliques du mannitol chez *A. brassicicola*

Pour rappel, le métabolisme du mannitol a été décrit chez certains champignons filamenteux notamment chez *A. alternata* par Vélèz *et al.* en 2006. Le mannitol serait synthétisé à partir du glucose via deux voies indépendantes (Solomon *et al.*, 2006 ; Vélèz *et al.*, 2006) (**figure 18**) même si les récents résultats présentés par Dulermo *et al.* (2010) laissent supposer l'existence d'une voie alternative de synthèse du mannitol encore inconnue. Pour chacune des voies, notre attention s'est portée sur deux enzymes particulières : la mannitol déhydrogénase (**MDH**) et la mannitol-1-phosphate déhydrogénase (**MPD**). Ces deux enzymes sont décrites comme étant la cible de la régulation du métabolisme du mannitol et sont au centre des études sur ce polyol. Les gènes codants la MDH et la MPD ont été caractérisés chez *A. brassicicola* par approches bioinformatique et moléculaire.

- Caractérisation de la mannitol déhydrogénase, **MDH** chez *A. brassicicola*

La protéine MDH décrite chez *A. alternata* (Vélèz *et al.*, 2006) a servi de référence pour l'identification d'un orthologue chez *A. brassicicola*. Une séquence protéique de 266 aa, présentant une similitude très élevée (plus de 98%) a été ainsi identifiée. La séquence nucléotidique codante est composée de 801 pb et est interrompue par un intron de 50 pb. La prédiction de la fonction de mannitol déhydrogénase est renforcée par la présence de séquences consensus conservées, signatures des enzymes de la famille des déhydrogénases / reductases (Hulo *et al.*, 2004) (**figure 19**).

- Caractérisation de la mannitol-1-phosphate déhydrogénase, MPD chez *A. brassicicola*

La même démarche expérimentale a été employée pour rechercher chez *A. brassicicola* l'orthologue de la MPD décrite chez *A. alternata* par Vélèz *et al.* (2006). La séquence génique retenue est constituée de 1 173 pb et ne possède pas d'intron. La protéine prédite de 390 aa présente une forte similitude (95%) avec la MPD d'*A. alternata*. Le motif caractéristique des enzymes de type mannitol déhydrogénase (Hulo *et al.*, 2004) est retrouvé de manière conservée dans la séquence protéique AbMPD1 (**figure 20**).

### 1.3. Analyse des séquences potentiellement régulatrices dans les séquences promotrices des gènes *Abmdh1* et *Abmpd1*

Pour identifier les sites potentiels de fixation de facteurs de transcription, la séquence de chaque gène située en amont du codon initiateur a été confrontée à la base de données du logiciel MatInspector (Quandt *et al.*, 1995), qui réfère différents motifs consensus décrits chez les champignons. L'analyse a eu lieu sur 1500 nucléotides pour *Abmpd1* et seulement sur 500 nucléotides pour *Abmdh1* (situé en bordure de contig). Ce type d'approche a permis d'identifier de nombreux sites potentiels de fixation de facteurs de transcription. Parmi eux, deux facteurs de transcription notamment présentent un intérêt pour l'étude du métabolisme des sucres en réponse aux stress : Mig1P et Msn2p/Msn4p. Ils possèdent tous deux un site potentiel de fixation dans chacun des deux gènes et sont donc susceptibles de réguler leur expression.

Mig1p permet le recrutement d'un complexe de répression. Il a été décrit chez *S. cerevisiae*, par Östling et Ronne (1997) qui montrent que le facteur de transcription est inactif en absence de glucose. La présence d'un site de fixation pour Mig1p suggère que l'expression d'*Abmdh1* et *Abmpd1* pourrait être régulée en fonction du pool de glucose cellulaire qui est le précurseur du mannitol. Les facteurs de transcription Msn2p/Msn4p ont été décrits comme intervenant dans l'induction de gènes lors de stress thermique, osmotique et oxydatif (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). Des sites de fixation potentiels pour les facteurs de transcription de type Hsf2 sont aussi prédits sur les séquences promotrices d'*Abmdh1* et *Abmpd1*. Ils sont notamment connus pour réguler la réponse adaptative aux stress thermique ou oxydatif et sont indispensables à la conidiogénèse chez *Neurospora crassa* (Thompson *et al.*, 2008). Curieusement, aucun site de fixation potentiel du facteur de transcription Hsf1 n'est prédit sur les séquences promotrices des deux gènes. Son rôle dans la régulation du métabolisme du mannitol est pourtant évoqué chez *Aspergillus fumigatus* notamment en réponse au stress thermique (Albrecht *et al.*, 2010).

### 1.4. Expression des gènes du métabolisme du mannitol

Un suivi des quantités de transcrits produits par *A. brassicicola* en condition standard de culture, a montré que les gènes *Abmdh1* et *Abmpd1* sont exprimés de façon constitutive et à des niveaux comparables (*Abmdh1*) voire supérieurs (*Abmpd1*) à ceux observés pour un gène de ménage fortement exprimé tel que celui codant la tubuline (résultats non présentés).



L'étude de l'expression des gènes *Abmdh1* et *Abmpd1*, au cours d'une cinétique d'infection sur chou, a été effectuée. Les mêmes temps que ceux choisis précédemment pour les dosages de sucres solubles présents *in planta* au cours de la phase infectieuse ont été retenus pour cette cinétique. La **figure 21** met en parallèle les niveaux d'expression des gènes du métabolisme du mannitol et la quantité de mannitol dosée *in planta*. Au cours des premiers jours de la phase infectieuse le gène codant la AbMPD1, déjà fortement exprimé de façon constitutive par le champignon, semble légèrement induit par rapport à la condition de culture *in vitro*. Cette enzyme est généralement considérée comme principalement impliquée dans la biosynthèse du mannitol. A l'inverse pour des temps très précoces (2 j.p.i) l'expression du gène codant la AbMDH1, généralement considérée comme principalement impliquée dans la dégradation du mannitol, est légèrement réprimée. Ceci pourrait alors expliquer le pic de mannitol enregistré *in planta* à 4 j.p.i. Une surexpression plus tardive des deux gènes apparaît six jours après inoculation.

#### 1.5. Mutagenèse dirigée chez *A. brassicicola* : création de mutants nuls dans les gènes du métabolisme du mannitol

La stratégie de génétique inverse utilisée consiste à éteindre un gène spécifique par mutagenèse dirigée afin de mesurer l'impact de sa délétion sur le phénotype du mutant et en déduire ainsi sa fonction. Pour évaluer l'importance respective de chacune des voies du métabolisme du mannitol, les gènes *Abmdh1* et *Abmpd1* ont tout d'abord été délétés séparément. Des doubles mutants délétés simultanément dans les gènes *Abmdh1* et *Abmpd1* ont également été générés. Cette double mutation doit permettre notamment de savoir si les voies MPD et MDH dépendantes sont les seules capables de conduire à la production de mannitol chez *A. brassicicola*. Si tel est le cas, le double mutant sera incapable de métaboliser ce polyol. Un tel génotype nous permettra alors d'élucider, au moins en partie, le rôle potentiel du mannitol notamment lors des phases infectieuses du cycle de vie du champignon. L'obtention de mutants est réalisée par insertion d'une cassette de disruption par recombinaison homologue avec le génome d'*A. brassicicola*. Un double crossing-over a lieu entre les parties 5' et 3' flanquant le gène ciblé permettant un remplacement spécifique et total de l'ORF du gène d'intérêt par un marqueur de sélection. Pour les simples mutants, où un seul gène est ciblé, le gène de résistance à l'hygromycine B a été utilisé comme marqueur de sélection. Pour obtenir un double mutant délété dans les deux gènes *Abmpd1* et *Abmdh1*, la souche mutante *AbΔmpd1* résistante à l'hygromycine B a été transformée avec une cassette de mutation ciblée sur le gène *Abmdh1* construite à l'aide d'un deuxième marqueur de sélection conférant la résistance à la nourséothricine (le gène *Nat*).

Les mutants sont sélectionnés puis monospores sur des milieux supplémentés en hygromycine B et/ou nouséothricine. Le monosporage permet de sélectionner parmi une colonie fongique, les conidies contenant théoriquement uniquement des noyaux transformés. Après deux étapes successives de monosporage, l'insertion spécifique de la cassette de mutation et l'absence de noyaux sauvages résiduels sont vérifiés. Deux clones par génotype, issus d'émergences indépendantes lors de la sélection initiale, sont conservés pour réaliser les différents tests phénotypiques.

- Validation des mutants du métabolisme du mannitol par PCR

Les jeux d'amorces utilisés sont les couples 2a/3b et 3a/2b pour lesquels la visualisation d'un amplicon permet de vérifier l'insertion et la localisation de la cassette de mutation (**figure 22**). Le couple 2a/2b permet de confirmer cette insertion par recombinaison homologue, par visualisation d'une différence de taille des amplicons obtenus avec le génome sauvage et le génome transformé. Pour vérifier qu'il ne subsiste plus le gène sauvage cible dans le génome des mutants sélectionnés, une PCR est effectuée avec le couple d'amorce 1a/1b spécifique du gène cible. Pour chacun des trois mutants, *AbΔmpd1*, *AbΔmdh1* et *AbΔmpd1Δmdh1*, la vérification par PCR a permis de mettre en évidence une différence de taille spécifique à l'insertion de la cassette de mutation dans l'ORF du gène cible ainsi que l'absence de signaux spécifiques du gène cible.

- Vérification des mutants par Southern-blot

Les mutants obtenus sont également vérifiés par Southern-blot. La sonde utilisée est spécifique de la région cible de la cassette de mutation. La validation de l'insertion se fait par la mesure d'une différence de taille entre les signaux spécifiques du génotype sauvage et des génotypes transformés. Cette différence observée et la présence des signaux aux tailles attendues attestent de l'insertion de la cassette dans la région ciblée du génome. L'absence de signaux supplémentaires à des tailles non prévues écarte la possibilité d'insertion multiple ou aléatoire dans une région non ciblée du génome d'*A. brassicicola* (**figure 23**).

- Dosage des activités des enzymes MPD et MDH

Les analyses PCR et Southern-blot ont confirmé l'insertion d'une unique cassette de mutation dans les gènes cibles du métabolisme du mannitol. L'étude de l'activité enzymatique de type MPD et MDH chez le génotype sauvage et les mutants permet de vérifier d'une part si la délétion des gènes a permis l'inactivation de la protéine correspondante et d'autre part si les protéines AbMPD1 et AbMDH1 sont les seules à assumer cette fonction chez *A. brassicicola*. La réduction des cofacteurs (NADPH/H<sup>+</sup> ou NADH/H<sup>+</sup>) par les extraits de protéines totales des différents génotypes est mesurée

après ajout dans le volume réactionnel des substrats des enzymes MDH (fructose) ou MPD (fructose-6-phosphate). L'absence d'activité MDH ou MPD pour les simples mutants correspondants confirme la délétion des gènes cibles (**tableau 2**). De même les doubles mutants *Ab43Δmpd1Δmdh1* ne présentent aucune activité MDH ou MPD confirmant l'inactivation des deux gènes dans cette souche. Ces données nous renseignent également sur le fait que chez *A. brassicicola*, seule la AbMPD1 est capable d'utiliser le Fructose-6-phosphate comme substrat pour produire du mannitol-1-phosphate. De même, la AbMDH1 semble la seule enzyme à pouvoir convertir le fructose en mannitol. Lorsque les activités des enzymes MDH chez *AbΔmpd1* ou MPD chez *AbΔmdh1* sont comparées aux activités chez le sauvage, aucune différence significative n'est observée. Cela indique que la délétion d'une enzyme ne semble pas avoir eu d'effet de compensation sur l'expression ou l'activité de la seconde.

#### 1.6. Dosage des sucres solubles présents dans les différents génotypes d'*A. brassicicola*

Pour connaître l'impact de la délétion d'un ou plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du mannitol sur la production de ce polyol et sur la proportion des sucres solubles totaux des différents génotypes, plusieurs analyses ont été réalisées combinant plusieurs techniques de chimie analytique.

Dans un premiers temps, les sucres solubles contenus dans les structures fongiques issues des différents génotypes d'*A. brassicicola* cultivés pendant 7 jours (milieu synthétique Vogel + 2% glucose, 150 rpm, 24°C) ont été extraits. L'analyse qualitative par RMN révèle un spectre spécifique pour chaque génotype. Les spectres caractéristiques du glucose, du tréhalose et du mannitol sont principalement détectés pour le génotype sauvage (**figure 24**). Le sucre majoritairement accumulé dans le mycélium des mutants *AbΔmdh1* est le mannitol, les autres sucres n'y sont pas détectés par cette méthode. Les mutants *AbΔmpd1* présentent un spectre RMN semblable au génotype sauvage mais le signal spécifique du mannitol est de plus faible intensité. Le spectre caractéristique des doubles mutants est dépourvu des signaux spécifiques du mannitol. De plus les signaux spécifiques du glycérol sont uniquement visibles sur les spectres des extraits de sucres des doubles mutants. Chez les deux mutants qui semblent affectés dans la production et accumulation du mannitol, *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1*, une plus forte accumulation de tréhalose que le génotype sauvage est observée. L'inactivation d'une ou des deux voies du métabolisme du mannitol entraîne des changements importants dans la teneur en sucres solubles chez *A. brassicicola*. Ces changements n'affectent pas seulement le mannitol, l'accumulation de tréhalose notamment semble également perturbée. Chacun des trois mutants à l'étude ici, présente un profil de sucres solubles qui lui est spécifique.

Afin de quantifier l'impact des mutations sur la teneur en mannitol, les extraits de sucres solubles du génotype sauvage et des mutants du métabolisme du mannitol ont été dosés par HPLC pour différents stades de croissance (**figure 25**). La perte d'une ou des deux voies entraîne une modification de concentration du polyol dans les conidies d'*A. brassicicola*. Le mannitol y est peu présent chez les simples mutants *AbΔmpd1* et *AbΔmdh1* ne représentant respectivement que 33% et 46% des quantités mesurées pour le génotype sauvage et il est indétectable chez le double mutant. Dans les jeunes hyphes issus de la germination des spores, les mutants *AbΔmdh1* accumulent du mannitol en proportion plus importante que le génotype sauvage. Chez les mutants *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1*, le mannitol n'est pas détecté. Ces mesures ont été effectuées sur du matériel fongique cultivé en microplaque dans du milieu complexe PDB pour se rapprocher des conditions qui seront utilisées lors des expériences de phénotypage (voir paragraphes suivants).

Pour les temps de cultures plus longs (mélange de mycélium mature et de conidies) dont sont issus les résultats d'analyse RMN (7 jours, milieu synthétique Vogel + 2% glucose, 24°C, 150 rpm), les dosages HPLC révèlent que le mutant *AbΔmdh1* accumule du mannitol à des concentrations supérieures à celles observées chez le génotype sauvage. En revanche, chez les mutants *AbΔmpd1*, la quantité de mannitol accumulée est deux fois moins importante que celle détectée chez la souche sauvage. Chez les doubles mutants, seules des traces de mannitol sont détectées.

### 1.7. Phénotypage des paramètres de croissance des mutants du métabolisme du mannitol

Les paramètres de croissance des mutants du métabolisme du mannitol ont été étudiés par néphélométrie. La néphélométrie est un outil récemment mis au point au sein du laboratoire CFN (voir *matériels et méthode*) permettant la mesure de la croissance de champignons filamenteux en temps réel en microplaque dans un volume de 300 µl. Une cinétique de mesures sur 24h aboutit à l'obtention d'une courbe de croissance représentative des premières étapes du développement du champignon, de la germination jusqu'à la ramification des jeunes hyphes. L'unité néphélométrique (RNU) est proportionnelle au poids sec d'*A. brassicicola*. Plusieurs paramètres issus de l'analyse de la courbe de croissance nous renseignent sur l'impact d'une mutation ou l'activité d'un composé.

La durée de la phase de latence (ou lag-time) est l'un de ces paramètres. Elle est définie par le temps mis avant d'atteindre une vitesse de croissance préalablement déterminée. Elle informe ainsi sur la période de latence avant la germination ou encore sur la viabilité des conidies. La pente maximale de la courbe est un autre des paramètres issus des courbes de croissance. Il renseigne sur la vitesse de croissance maximale (VM) du champignon. Des deltas de lag-time ou de VM sont calculés entre la condition testée et la condition de référence. L'aire sous la courbe, avant que cette dernière n'atteigne la saturation peut également être calculée. La comparaison des aires de la

condition témoin avec celles de la condition d'intérêt permet d'exprimer les résultats en pourcentage d'inhibition de croissance. Ces indices permettent d'évaluer l'impact d'une mutation et, ou la réponse à divers *stimuli*.

La **figure 26** illustre les courbes de croissance des différents génotypes obtenues par néphélométrie dans le milieu PDB. Dans ces conditions, les compositions glucidiques intracellulaires différentes pour chaque génotype influencent la germination ainsi que l'élongation des hyphes ou leur ramification. Cependant les différences enregistrées ne sont pas significatives (au seuil de 1% avec un test de Student) sauf chez les mutants *AbΔmdh1* où la perte de l'enzyme retarde le temps moyen de germination des mutants de presque 3h.

### 1.8. Réponses des mutants du métabolisme du mannitol aux stress oxydatifs

Plusieurs études sur le mannitol démontrent ses propriétés anti-oxydantes *in vivo* et *in vitro* : elles ont contribué à élaborer l'hypothèse que ce polyol pouvait intervenir dans la tolérance au stress oxydatif généré par les plantes lors d'une infection. Nous disposons avec les trois mutants du métabolisme du mannitol d'outils biologiques pour tester cette hypothèse.

- Etude du potentiel anti-oxydant

La perte d'une ou des deux voies métaboliques du mannitol entraîne une modification de la proportion de sucres solubles accumulés par *A. brassicicola*. Les différents génotypes sont cultivés en milieu liquide (Vogel 2% glucoses, 24°C, 150 rpm) pendant sept jours. Le potentiel anti-oxydant des sucres solubles totaux contenus dans les extraits des différentes colonies d'*A. brassicicola* a été évalué par un test DPPH (**figure 27**). Seuls les extraits de sucres solubles issus du mycélium des mutants *AbΔmpd1Δmdh1* présentent un potentiel antioxydant plus faible que celui retrouvé chez les extraits issus du génotype sauvage. Le DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical stable R° à température ambiante de couleur bleue intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres) se fait en mesurant la décoloration (violet jaune) due à la réduction de DPPH° par les composés antioxydants putatifs. La perte d'une seule voie du métabolisme du mannitol ne semble pas altérer de façon significative la capacité à fixer les radicaux libres des extraits de sucres solubles. Cependant le test DPPH ne permet pas d'évaluer le potentiel antioxydant contre des molécules comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est notamment rencontrée par le champignon lors de l'interaction. Pour définir si le mannitol joue un rôle clef dans la protection contre les FAO d'autres tests de pouvoir antioxydant sont à envisager sur les extraits de sucres solubles des différents génotypes. Par exemple un test de type ORAC (Oxygen radical absorption capacity) ou AARS (Activité antiradicalaire

superoxyde O<sub>2</sub><sup>\*</sup>) pourront être menés. Les résultats seraient alors plus représentatifs de l'activité antiradicalaire des extraits de sucres.

- Etude de la réponse au stress oxydatif généré par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Au cours de l'interaction avec la plante hôte, le stress oxydatif peut notamment être provoqué par une augmentation drastique de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au point d'infection. Pour étudier l'implication potentielle du métabolisme du mannitol dans la réponse adaptative à ce type de stress, la sensibilité des mutants a été testée par néphélométrie en effectuant des mesures de croissance en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à différentes concentrations (**figure 28**). Une différence significative de sensibilité à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des mutants est révélée par cette étude. Les trois mutants sont moins tolérants à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que le génotype sauvage Ab43wt. De façon étonnante, les doubles mutants *AbΔmpd1Δmdh1* semblent légèrement moins sensibles que les deux simples mutants *AbΔmpd1* et *AbΔmdh1*.

- Etude de la réponse au stress oxydatif généré par les isothiocyanates

L'analyse néphélométrique de la croissance des mutants du métabolisme du mannitol en présence d'AI-ITC a été réalisée pour mesurer la sensibilité à ce type de stress oxydatif intracellulaire. La tolérance aux ITC est significativement différente selon les génotypes testés. À des concentrations tolérées par le génotype sauvage, notamment 5 mM d'AI-ITC, les souches *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1* sont sensibles (**figure 29**). Les souches *AbΔmdh1* présentent une tolérance similaire à la souche de référence Ab43wt. La sensibilité des simples mutants *AbΔmpd1* et celle des doubles mutants s'observe également à de plus faibles concentrations (2,5 mM). Leur temps de latence est plus élevé que celui des souches plus tolérantes comme Ab43wt et *AbΔmdh1*. Les concentrations en ITC *in planta* sont difficiles à estimer étant donné qu'ils sont issus de la dégradation des glucosinolates au point d'infection. Toutefois il a été montré chez *A. thaliana* que certaines cellules contiennent environ 100 mM de glucosinolates. Sachant qu'environ 8% des glucosinolates sont dégradés en ITC, les concentrations inhibitrices identifiées dans notre étude sont donc compatibles avec celles potentiellement existantes *in planta* (Halkier and Gershenzon, 2006).

L'exposition des mutants du métabolisme du mannitol aux AI-ITC semble indiquer que la réponse adaptative pourrait être liée à la voie MPD dépendante. Pour déterminer si ces mécanismes de protection impliquent une remobilisation des sucres vers la neosynthèse de mannitol, ce polyol a été dosé dans le mycélium du champignon suite à l'exposition à une dose sub-létale (1mM) d'AI-ITC (**figure 30**). Dans ces conditions, l'exposition aux AI-ITC ne modifie pas significativement les contenus intracellulaires en mannitol des 4 génotypes testés par rapport à la condition non traitée. Cependant

une légère augmentation du polyol est à noter chez le génotype sauvage. Cette tendance à l'accumulation est cohérente avec la suppression du gène *Abmpd1* lors d'une cinétique d'exposition aux AI-ITC (**figure 31**). Chez les mutants délétés dans ce gène, la néosynthèse de mannitol dans les hyphes en réponse à ce stress est impossible, entraînant probablement une sensibilité accrue aux dérivés des glucosinolates. L'expression du gène *Abmdh1* est quand à elle plutôt réprimée dès perception des AI-ITC (30 minutes). Même si au cours du temps le niveau de transcripts augmente, son expression ne dépasse jamais celle observée en condition témoin.

- Etude de la réponse au stress oxydatif généré par la ménadione

Un stress oxydatif intracellulaire peut également être généré *in vitro* par divers composés comme par exemple la ménadione. Les résultats de sensibilité aux AI-ITC des mutants ont été confrontés à ceux obtenus avec ce composé de référence selon la même méthodologie (**figure 32**). Les profils des quatre génotypes traités avec de la ménadione est cohérent avec ceux obtenus lors des tests de sensibilité aux AI-ITC: les mutants *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1* sont significativement plus sensibles que le génotype sauvage. Le phénotype de sensibilité à la ménadione des mutants *AbΔmdh1* est très proche de celui du génotype sauvage.

#### 1.9. Sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol à la phytoalexine brassinine

Outre les ITC, *A. brassicicola* est confronté à d'autres défenses chimiques d'origine végétale lors de l'interaction. La brassinine est une phytoalexine spécifique des Brassicacées présente notamment chez le chou utilisé comme plante hôte dans notre étude. Des résultats préliminaires semblent indiquer que la brassinine pourrait générer un stress oxydatif. L'analyse de la sensibilité à la brassinine des mutants du métabolisme du mannitol d'*A. brassicicola* montre un profil relativement similaire à la réponse aux AI-ITC (**figure 33**). La sensibilité des mutants *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1* est accrue face à cette phytoalexine par rapport au génotype sauvage. Les mutants *AbΔmdh1* ont une réponse proche d'Ab43wt. La plupart des différences significatives observées sont dues à un allongement de la lag-time.

#### 1.10. Tolérance aux stress thermiques

Parmi les nombreux rôles physiologiques supposés du mannitol, il lui est également attribué une fonction protectrice contre les stress thermiques (Ruijter *et al.*, 2003). Il serait éventuellement capable de mimer les molécules d'eau lors d'un dessèchement ou prémunir la formation de cristaux lors de la congélation. Les organes de conservation et de dissémination du champignon ont été exposés pendant 24h à des stress thermiques notamment à 4°C ou à de très basses températures conduisant à la congélation (20°C et -80°C). La viabilité des conidies ainsi traitées est évaluée par

néphélométrie. Le temps de latence dans ce cas est représentatif du pool de conidies qui auront tolérées le traitement thermique. La différence de lag-time entre la condition témoin et la condition traitée renseigne sur la sensibilité de la souche au stress appliqué. Un traitement de 24h à 4°C ou à -20°C n'a pas significativement d'effet sur la survie des conidies d'*A. brassicicola* et ce quel que soit le génotype testé (**figure 34**). Ce champignon semble relativement bien tolérer le froid et même une brusque congélation à -80°C pendant 24h. Seule la survie des conidies des génotypes *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1* semble significativement affectée par cette température extrême.

### 1.11. Réponse des mutants du métabolisme du mannitol à des stress hydriques et osmotiques

Plusieurs sucres ou polyols sont connus pour intervenir dans la réponse adaptative aux stress osmotiques (Quain *et* Boulton, 1986). C'est par exemple le cas du glycérol. Comptant parmi les molécules les plus abondantes dans le règne fongique, il est légitime de supposer que le mannitol pourrait également jouer un rôle dans ce type de mécanismes de protection. Cette hypothèse a été testée en évaluant la tolérance des mutants d'*A. brassicicola* affectés dans le métabolisme du mannitol à différents types de stress osmotiques.

- Sensibilité à un stress matriciel (PEG)

Le polyéthylène glycol (PEG) étant une macromolécule qui ne pénètre pas dans les cellules fongiques, sa présence diminue la disponibilité en eau dans le milieu induisant un stress matriciel. Un apport contrôlé de PEG dans le milieu de culture permet d'agir avec précision sur le potentiel hydrique. -0,25 MPa correspond au potentiel hydrique d'un milieu de culture classique et -1,7 MPa à celui retrouvé en surface des graines après leur maturation.

L'impact du PEG ne peut directement être testé en néphélométrie car la formation de sphérophores interfère avec la détection de la croissance fongique. La tolérance au stress matriciel induit par le PEG a donc été évaluée en milieu solide sur des temps plus long et pour des potentiels hydriques plus faibles (**figure 35**). Même si les doubles mutants *AbΔmpd1Δmdh1* ont une croissance plus faible que les autres génotypes en condition standard de culture (-0,25 MPa), ce génotype apparaît très sensible à une baisse du potentiel hydrique : respectivement 60% et 70% environ d'inhibition de croissance par rapport à la condition témoin non traitée pour des potentiels hydrique de -0,7 MPa et -1,7 MPa. Les mutants *AbΔmpd1* semblent également plus sensible que le génotype sauvage (respectivement 30% et 40% environ d'inhibition de croissance par rapport à la condition témoin non traitée pour des potentiels hydrique de -0,7 MPa et -1,7 MPa). Leur croissance est plus inhibée à un potentiel hydrique de -0,7 MPa ; cependant elle est du même ordre que le génotype sauvage pour des potentiels plus bas (-1,7 MPA). Les mutants *AbΔmdh1* ont un phénotype spécifique



caractérisé par une forte résistance au stress matriciel. Ces mutants qui accumulent majoritairement du mannitol sur des temps long de culture semblent même avoir leur croissance stimulée sur un milieu au potentiel hydrique de -0,7 MPa.

- Sensibilité au stress osmotique (sorbitol)

Un stress osmotique peut également être généré par ajout de sorbitol au milieu de culture. La tolérance des mutants du métabolisme du mannitol à ce type de stress osmotique a tout d'abord été testée sur des temps courts de croissance par néphélométrie (**figure 36**). L'analyse de l'allure générale des cinétiques de croissance ne montre pas de différence marquée de phénotype entre le génotype sauvage et les mutants *AbΔmdh1* et *AbΔmpd1*. Seuls les doubles mutants apparaissent comme significativement plus sensibles à ce type stress qu'Ab43wt pour les phases précoces de son développement.

La tolérance au stress osmotique généré par le sorbitol a également été évaluée sur des temps d'incubation plus élevés sur milieu solide (**figure 37**). La mesure de la croissance radiale des différents génotypes après 7 jours d'incubation à 24°C ne montre pas de différence significative par rapport au génotype sauvage.

- Sensibilité au stress salin (NaCl)

Une forte concentration de NaCl dans le milieu de culture peut provoquer chez un organisme un grand nombre de dommages notamment une altération de l'assimilation d'ions ( $K^+$  ou  $Ca^+$ ) ou de nutriments essentiels à la croissance, une accumulation d'ions toxiques (essentiellement  $Na^+$ ) et des stress osmotique et oxydatif (Verslues *et al.*, 2006). L'exposition des différents génotypes à de fortes concentrations en NaCl a permis de mesurer leur sensibilité face à ce type de stress. La perte d'une ou des deux voies du métabolisme du mannitol n'affecte pas la sensibilité d'*A. brassicicola* (**figure 38**).

#### 1.12. Importance des voies du métabolisme du mannitol dans l'assimilation de ressources carbonées

Nous avons cherché à savoir si le mannitol est une ressource de carbone assimilée et utilisée par le champignon. Ainsi la croissance radiale des différents génotypes sur des milieux contenant seulement cette source de carbone a été évaluée. Les différents génotypes ont, dans un premier temps, été cultivés sur milieu Vogel sans sucre ajouté. Des explants de ces pré-cultures sont prélevés pour être repiqués sur des milieux Vogel supplémenté ou non avec 2% de mannitol. La croissance radiale du champignon est mesurée après 14 jours d'incubation à 24°C (**figure 39**). Le mannitol ne semble pas être assimilé par le champignon inhibant même la croissance du génotype sauvage. Les

doubles mutants *AbΔmpd1Δmdh1* ont une croissance très limitée pour ces deux types de milieu. Les mutants *AbΔmpd1* présentent un comportement similaire à la souche sauvage alors que les mutants *AbΔmdh1* ont une croissance stimulée lorsqu'ils sont cultivés en présence de mannitol. L'inhibition de croissance de la souche sauvage semble indiquer que le polyol n'est à priori pas assimilé par *A. brassicicola*. L'effet du mannitol sur la croissance pourrait alors être plutôt lié à une augmentation de la pression osmotique du milieu de culture ou un stress matriciel. Cette dernière hypothèse semble cohérente à la vue des résultats obtenus par comparaison avec ceux obtenus sur des milieux supplémentés en PEG (voir figure 35).

### 1.13. Etude de l'expression du pouvoir pathogène des mutants du métabolisme du mannitol

L'objectif de cette étude est de contribuer à élucider le rôle, chez *A. brassicicola*, du mannitol et de ses voies métaboliques lors de l'interaction avec son hôte. Les altérations phénotypiques des mutants du métabolisme du mannitol par rapport au génotype sauvage observées *in vitro* dans la réponse à certains stress se traduit-elle par une modification de la pathogénie *in planta*? Des expériences d'inoculation des mutants sur plante hôte donnent une idée de l'importance de ce polyol et des voies MPD- et MDH-dépendantes dans l'expression par le champignon de trois composantes clés du pouvoir pathogène : la virulence, l'agressivité et la sporulation *in planta*.

- Virulence et agressivité *in planta* des mutants du métabolisme du mannitol

La virulence est la capacité d'un pathogène à produire des symptômes sur plante. Pour évaluer cette composante qualitative du pouvoir pathogène, une suspension de conidies calibrée ( $10^5$  conidies/ml) est déposée sur feuilles de chou (*Brassica oleracea*). Après 6 jours d'incubation, les symptômes produits sont évalués par mesure du diamètre de la zone nécrosée (**figure 40**). A cette forte pression parasitaire, chacun des mutants est toujours capable de provoquer une nécrose entourée d'un halo chlorotique caractéristique chez le chou. Les différentes mutations ne semblent pas affecter la virulence des souches.

L'agressivité d'un pathogène se mesure par l'importance des symptômes provoqués. Ainsi une différence de diamètre de nécrose entre deux souches inoculées sur plantes à des concentrations équivalentes, traduit une différence d'agressivité. Cette composante quantitative du pouvoir pathogène a été évaluée par inoculation de plusieurs dilutions de suspensions de conidies ( $10^3$ ,  $10^4$  et  $10^5$  conidies/ml) selon le même processus que précédemment. La sévérité du symptôme provoqué est théoriquement d'autant plus importante que la charge parasitaire inoculée est forte. Pour chaque feuille le génotype sauvage Ab43wt est inoculé en face d'un génotype muté. Les différences de taille de symptôme observées révèlent l'impact des mutations sur l'agressivité

d'*A. brassicicola* (**figure 40**). Pour les simples mutants *AbΔmdh1* une différence d'agressivité significative avec la souche de référence est observée. Pour les plus faibles pressions parasitaires testées, la différence d'agressivité entre ces deux génotypes peut représenter jusqu'à 50% de la taille du symptôme. Cette différence d'agressivité est encore plus prononcée pour les génotypes *AbΔmpd1* (jusqu'à 70% moins agressif qu'*Ab43wt* dans les mêmes conditions) et les génotypes *AbΔmpd1Δmdh1* qui inoculés à  $10^3$  conidies par ml, ne forment pratiquement plus de nécrose.

- Germination et pénétration *in planta*

Une différence d'agressivité entre les mutants du métabolisme du mannitol et le génotype sauvage a été observée sur choux. La germination des conidies et la pénétration des hyphes *in planta* sont parmi les phases les plus critiques de l'infection. Une coloration au solophényl (colorant spécifique des structures fongiques) permet de visualiser *in planta* ces étapes précoces de l'interaction (**figure 41**). L'observation un jour après inoculation du développement *in planta* montre que 95% des conidies des différents génotypes sont germées. Pour le génotype sauvage et pour les simples mutants *AbΔmdh1*, environ 40 % des hyphes ont formés des structures spécifiques à la pénétration de la cuticule : les pseudo-appressoria. Seulement 20% des hyphes des mutants *AbΔmpd1* en différencient. Des observations deux jours après inoculation ne révèlent pas de différences entre le génotype sauvage, les mutants *Ab43Δmdh1* et *AbΔmpd1*, suggérant que ce dernier semble avoir rattrapé son retard de germination. Les doubles mutants ne présentent pas ou très peu de points de pénétration (environ 5% des hyphes) à un jour après inoculation. Un jour plus tard, les hyphes des génotypes *AbΔmpd1Δmdh1* ce taux n'a pas évolué.

- Quantification de la sporulation

Outre la virulence et l'agressivité, la sporulation est une autre composante essentielle du pouvoir pathogène. Des travaux montrent que chez *S. nodorum*, l'interruption de la voie MPD-dépendante entraîne une perte de la sporulation *in planta* (Solomon *et al.*, 2004). Le mannitol pourrait être impliqué dans les mécanismes de production de conidies durant l'interaction. Cet aspect du pouvoir pathogène est primordial car il va conditionner la dissémination de la maladie. Nous avons donc étudié, chez *A. brassicicola*, la capacité des mutants du métabolisme du mannitol à sporuler *in vitro* et *in planta*.

Dans un premier temps la sporulation des souches a été évaluée *in vitro* en milieu liquide. Les différents génotypes sont cultivés durant sept jours dans du milieu Vogel (24°C, 150rpm) complémenté avec 2% de glucose. A l'issue de cette période d'incubation le mycélium récolté est dissocié par broyage pour isoler les conidies. Leur nombre est estimé par plusieurs comptages à la

cellule de Malassez (**figure 42**). Le poids sec du broyat est pesé après séchage à l'étuve. L'aspect des agrégats mycéliens formés par les quatre génotypes en culture liquide est très variable. L'aspect du mutant *AbΔmpd1* est proche visuellement de celui du génotype sauvage (amas mycéliens noirs de tailles inégales, friables et riches en conidies). Le mutant *AbΔmdh1* forme un mycélium blanchâtre très dense, résistant à un broyage classique (billes de verre et vortex). Le double mutant *AbΔmpd1AbΔmdh1* possède un phénotype intermédiaire entre le mutant *AbΔmdh1* et le génotype sauvage ; les agrégats mycéliens sont de couleur légèrement grisée, denses mais peu résistants à un broyage. La quantification des conidies produites *in vitro* est cohérente avec l'aspect des colonies. La souche *Ab43wt* est très sporulante, les génotypes *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1AbΔmdh1* produisent significativement moins de conidies (1 tiers de moins par gramme de poids sec de mycélium). Le mutant *AbΔmdh1* ne produit, dans ces conditions, que très peu de conidies (95% de moins que le génotype sauvage).

Afin de faire le lien entre ce phénotype observable *in vitro* et le pouvoir pathogène, la sporulation des différents génotypes a été évaluée *in planta* (**figure 43**). L'observation des nécroses à la loupe binoculaire laisse supposer une différence de sporulation entre la souche sauvage et au moins les souches mutées *AbΔmdh1* et *AbΔmpd1Δmdh1*. Une approche plus fine de quantification de la sporulation permet de mettre en évidence une baisse significative de la production de conidies *in planta* pour les trois mutants du métabolisme du mannitol comparé à la souche sauvage. Les différences de quantités de conidies produites *in planta* par les différents génotypes sont comparables à celles observées précédemment *in vitro*.

- Conservation sur les semences

Pour un pathogène transmissible par les semences, sa conservation sur le tégument de la graine est une condition *sine qua none* pour la réalisation complète de son cycle parasitaire. Lors de leur maturation les semences sont soumises à une phase importante de dessiccation qui peut abaisser le potentiel hydrique à sa surface jusqu'à -1,7 MPa. Les conidies doivent survivre à ce stress abiotique et garder leur capacité germinative pour pouvoir amorcer un nouveau cycle. Un protocole d'estimation du taux de contamination de graines par néphélométrie a été mis au point pour évaluer la conservation des conidies sur le tégument. Avant la mise en conservation, le temps de latence observé pour un lot de graines inoculées *in vitro* fournit une estimation du taux initial de contamination des graines. Le reste des graines est ensuite placé en condition de conservation (obscurité, faible humidité relative) pendant un laps de temps défini à l'issue duquel la population de conidies ayant survécu sur les semences est évaluée par analyse néphélométrique (*voir matériel et méthodes, page 103*). Ce test a été réalisé pour le génotype sauvage d'*A. brassicicola* et les mutants

du métabolisme du mannitol (**figure 44**). Après un mois seulement de conservation, la concentration en conidies sauvages viables sur la graine de radis a diminué de plus de 50%. Ce taux de viabilité semble se maintenir dans le temps car il reste identique après deux mois de conservation. Les conidies du génotype *AbΔmpd1* ne présentent pas de différences significatives de viabilité par rapport au génotype sauvage. En revanche, dès le premier mois de conservation, plus de 70% des conidies des doubles mutants *AbΔmpd1Δmdh1* ne germent plus. A l'inverse, la perte de la voie MDH-dépendante semble conférer aux conidies une meilleure capacité de survie sur la graine durant le premier mois de conservation. Plus de 70% des conidies du génotype *AbΔmdh1* présentes sur la graine sont encore capable de germer à ce stade. Après deux mois de conservation, le taux de survie de ces conidies a toutefois diminué au point de se rapprocher de celui relevé pour le génotype sauvage (50%).

### 1.14. Synthèse et discussion des résultats

(Le **tableau 3** rassemble les principaux résultats.)

Le mannitol a fait l'objet de plusieurs études sans pour autant que son rôle chez les champignons ne soit clairement défini. Ses voies métaboliques ont été décrites (Vélèz *et al.* 2006) mais leurs fonctions spécifiques restent encore à préciser. Cette étude a pour but de contribuer à mieux caractériser le rôle encore énigmatique du mannitol chez les champignons et notamment son implication potentielle dans la pathogénie en utilisant le champignon nécrotrophe *A. brassicicola* comme modèle. Comme chez *A. Alternata* le métabolisme du mannitol se décompose en deux voies indépendantes. Les enzymes MDH et MPD appartenant respectivement à chacune des deux voies sont le centre d'intérêt des recherches sur le rôle de ce polyol car elles semblent être les cibles principales de la régulation de ce métabolisme. Leurs homologues ont été caractérisés chez *A. brassicicola*. Elles présentent une très forte identité avec les protéines caractérisées chez *A. alternata*. La production de mannitol par *A. brassicicola* a été vérifiée *in vitro* dans un premier temps par dosage des sucres solubles contenus dans le mycélium. Nous avons montré qu'*A. brassicicola* synthétise du mannitol et que son accumulation est stimulée par des extraits de plante hôte. Au cours de l'interaction avec le chou, le mannitol s'accumule dans les feuilles infectées comme cela a déjà été démontré dans le pathosystème *B. cinerea* / tournesol (Dulermo *et al.*, 2009) confortant son rôle potentiel dans le pouvoir pathogène du champignon. Cette accumulation s'accompagne de la surexpression *in planta* du gène codant l'enzyme AbMPD1. La voie MPD-dépendante est souvent citée comme la principale voie de production de mannitol chez les champignons (Solomon *et al.*, 2004 ; Vélèz *et al.*, 2006 ; Dulermo *et al.*, 2009). Le gène *Abmdh1* est induit plus tardivement *in planta* comme cela a déjà été observé chez *Uromyces fabae* lors de son interaction avec *Vicia faba* (Voegele *et al.*, 2005). La voie MDH-dépendante est associée au catabolisme du polyol (Solomon *et al.*, 2004 ; Vélèz *et al.*, 2006 ; Dulermo *et al.*, 2009). La surexpression d'*Abmdh1 in planta* coïncide avec l'apparition des premières conidies dans le pathosystème *A. brassicicola* / chou suggérant également chez *A. brassicicola* un rôle de cette enzyme dans la sporulation.

L'interruption de la voie MDH-dépendante entraîne chez *A. niger* une perte de la capacité à sporuler *in vitro* (Aguilar-Osorio *et al.*, 2010). Nos résultats confirment l'importance de cette enzyme dans la sporulation chez *A. brassicicola*. La sporulation *in vitro* et *in planta* des mutants d'*A. brassicicola* est également fortement affectée. La perte de la capacité à sporuler *in planta* de mutants du métabolisme du mannitol avait déjà été observée chez *S. nodorum* (Solomon *et al.*, 2004). Le métabolisme du mannitol et notamment la voie MDH-dépendante apparaît comme essentielle à la sporulation des champignons producteurs de mannitol et donc à leur multiplication

ou dissémination dans les tissus végétaux. La fusion des gènes codant des homologues de AbMPD1 et AbMDH1 chez *A. niger* avec le gène codant la GFP montre une différenciation spatiale de leur expression. La MPD est présente dans tous les organes végétatifs du champignon alors que la MDH n'est localisé que dans les conidies ou les hyphes matures sporulant. Aucune activité de cette protéine n'est détectée dans les jeunes hyphes non sporulant (Aguilar-Osorio *et al.*, 2009). La production de mannitol via la voie MPD-dépendante joue également un rôle dans la production de conidies mais dans une moindre mesure.

Lorsque le champignon s'avère incapable de produire du mannitol, un mécanisme compensatoire semble se mettre en place pour permettre la sporulation. La plus forte teneur en tréhalose dans les conidies des doubles mutants *AbΔmpd1Δmdh1* qui sporulent malgré la perte de la voie MDH-dépendante laisse supposer que ce sucre pourrait jouer un rôle de substitution. L'importance du métabolisme du tréhalose dans la conidiogénèse a en effet été démontrée chez *S. nodorum* (Lowe *et al.*, 2009).

Le mannitol est présent à des concentrations importante chez le champignon à tous les stades de vie et dans tous les organes. L'ensemble des résultats de dosage des sucres solubles obtenus à partir des extraits des doubles mutants *AbΔmpd1Δmdh1* démontre que les deux voies métaboliques décrites semblent être à l'origine de la quasi totalité du mannitol produit chez le champignon. Toutefois, la présence de traces de mannitol dans les colonies matures de ce génotype supporte l'hypothèse de Dulermo *et al.* (2009) qui stipule l'existence d'une troisième voie métabolique. Le tréhalose est suraccumulé chez ces mutants par rapport au génotype sauvage comme cela avait déjà été observé chez *S. nodorum* (Solomon *et al.*, 2006). La perte des voies MPD- ou MDH-dépendantes provoque, dans les conidies, une diminution drastique du mannitol accumulé (juqu'à - 70%) et une légère augmentation du tréhalose (+ 20% environ). Des résultats similaires ont été obtenus chez *A. niger* et *S. nodorum* (Ruijter *et al.*, 2003 ; Solomon *et al.*, 2004 et 2006). Ces altérations dans la composition en sucres des conidies n'affectent que très légèrement leur pouvoir germinatif et leur vitesse maximale de croissance.

La voie MPD-dépendante semble être la voie majoritaire de synthèse du mannitol mais la voie MDH-dépendante peut prendre le relai et assurer jusqu'à 50% de la production normale de mannitol lorsque que le gène *Abmpd1* est inactivé. La réaction catalysée par la mannitol-1-phosphatase comme décrit chez *A. alternata* (Vélèz *et al.*, 2006) ne serait pas réversible. Seule la voie MDH-dépendante semble donc responsable du catabolisme du mannitol. Cette hypothèse explique la suraccumulation de mannitol chez les mutants *AbΔmdh1*. L'absence à des seuils détectables de

glucose et de tréhalose chez ces mutants est cohérente avec l'existence de liens étroits entre les différentes voies de synthèse des glucides (**figure 45**).

Jennings *et al.* en 1998 ont montré que le mannitol avait des propriétés antioxydantes *in vitro* et *in planta*. Par génétique inverse nous avons altéré le métabolisme de ce polyol chez *A. brassicicola*. La sensibilité des mutants créés face aux FAO a été mesurée afin d'évaluer l'importance de ce métabolisme dans les mécanismes de protection contre les stress oxydatifs notamment ceux potentiellement rencontrés *in planta*. Les tests ont été réalisés par suivi de la croissance fongique par néphélométrie sur 24h, ce qui correspond aux stades précoces du cycle infectieux où le champignon est confronté aux défenses chimiques de la plante hôte. Dans un premier temps la tolérance au stress oxydatif extracellulaire a été testée par ajout dans le milieu d' $H_2O_2$  à des concentrations physiologiquement compatibles avec celles mesurées lors d'un *burst* oxydatif *in planta* (Kuzniak and Urbanek, 2000). La présence des deux voies MPD- et MDH-dépendante du métabolisme du mannitol, fonctionnelles simultanément, semble essentielle à la tolérance au stress oxydatif extracellulaire. La sensibilité à l' $H_2O_2$  est corrélée avec une faible teneur en mannitol dans les conidies des mutants étudiés. Le *burst* oxydatif est une composante des mécanismes de défenses des végétaux qui intervient très précocement dans l'interaction (Parent *et al.*, 2007). Les conidies sont parmi les principaux organes fongiques sujets à ce stress. Lorsque les voies de biosynthèses du mannitol sont toutes les deux interrompues, un autre mécanisme de protection semble prendre le relais. Le mannitol pourrait avoir un rôle transitoire, produit par la voie MPD-dépendante, il serait ensuite remobilisé par la voie MDH-dépendante en un composé au pouvoir antioxydant plus important. Ce composé pourrait être le tréhalose (Lowe *et al.*, 2004) ce qui expliquerait la meilleure tolérance des doubles mutants qui accumulent ce sucre en quantité plus importante que la souche sauvage ou les simples mutants.

Dans le pathosystème *A. brassicicola* / *Brassicacées*, le stress oxydatif peut être généré chez l'agent pathogène au niveau intracellulaire via l'action des ITC (Sellam *et al.*, 2007). De récentes études transcriptomiques sur la réponse de *S. cerevisiae* exposé à la brassinine laisse supposer que cette phytoalexine pourrait également être à l'origine d'un stress oxydatif intracellulaire dans les cellules fongiques (T. Guillemette et A. Sellam, communication personnelle). Ce type de stress oxydatif intracellulaire a lieu plus tardivement dans la phase infectieuse. Ce sont alors les tubes germinatifs et les jeunes hyphes notamment qui vont y être soumis au stress oxydatif. L'étude de la croissance durant ces stades précoces des mutants *AbΔmpd1*, *AbΔmdh1* et *AbΔmpd1Δmdh1* en présence de ces molécules de défense des *Brassicacées* ou de ménadione a permis de montrer que la production et l'accumulation de mannitol est essentielle à la tolérance d'*A. brassicicola* à un stress oxydatif interne. Les mutants *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1* qui sont déficients en mannitol dans ces



conditions (24h après germination), sont sensibles aux AI-ITC ou dans une moindre mesure à la brassinine et la ménadione. Au contraire, les mutants *AbΔmdh1* qui ne sont pas altérés dans l'accumulation de ce polyol sont aussi tolérants que le génotype sauvage. La voie MPD-dépendante notamment par son rôle de synthèse du mannitol semble donc importante pour une tolérance aux stress oxydatifs intracellulaires en particulier ceux générés par les ITC à des doses potentiellement rencontrées *in planta*. Cette hypothèse est soutenue par l'induction de l'expression du gène *Abmpd1* en présence d'AI-ITC.

Les essais *in planta* montrent que la virulence n'est nullement affectée par des mutations dans les gènes du métabolisme du mannitol en accord avec les observations déjà réalisées chez *S. nodorum* (Solomon *et al.*, 2004 et 2006). L'agressivité d'*A. brassicicola* par contre, est conditionnée par l'activité des gènes *Abmdh1* et *Abmpd1*. La baisse d'agressivité observée pour l'ensemble des génotypes mutants peut être liée à une plus grande sensibilité au *burst* oxydatif généré lors des phases précoces de l'interaction. Toutefois les effets de ces perturbations du métabolisme du mannitol sur l'agressivité sont certainement pléiotropes. Ainsi, les mutants *AbΔmpd1* et *AbΔmpd1Δmdh1* peuvent également être altérés dans leur capacité à synthétiser de la brassicolin A, si on admet que le mannitol en est précurseur (Gloer *et al.*, 1988). Cette toxine d'*A. brassicicola* a été décrite comme étant responsable d'une majeure partie de la chlorose et nécrose des tissus végétaux (Pedras *et al.*, 2009). La perte de cette toxine pourrait aussi expliquer la diminution de l'agressivité de ces deux mutants. Un dosage des teneurs en brassicolin A chez les différents génotypes *in vitro* et *in planta* permettrait de vérifier cette hypothèse. La diminution de l'agressivité pourrait aussi être liée, chez les mutants *AbΔmdh1*, à une diminution de leur capacité à sporuler *in planta*, et chez les mutants *AbΔmpd1* et les doubles mutants à leur faible capacité à pénétrer les tissus végétaux et à une hypersensibilité aux ITC et à la brassinine.

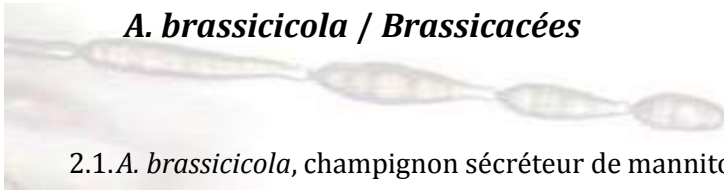
Le métabolisme du mannitol semble être impliqué dans de nombreux autres mécanismes de protection du champignon notamment contre certains stress abiotiques. La voie MPD-dépendante participe au mécanisme qui permet aux conidies de survivre à une période de congélation de 24 heures à - 80°C. Le mannitol pourrait limiter la formation de cristaux de glaces létaux pour le champignon comme cela a été supposé chez *A. niger* (Ruijter *et al.*, 2003). La perte d'une ou des deux voies du métabolisme du mannitol n'affecte que très peu la capacité d'*A. brassicicola* à s'adapter aux stress osmotique. Le métabolisme du mannitol ne semble avoir qu'un rôle très minoritaire dans la régulation de la pression osmotique comme cela a déjà été suggéré (Solomon *et al.*, 2004). L'analyse *in silico* des promoteurs des gènes *Abmpd1* et *Abmdh1* suppose leur régulation par les facteurs de transcription Msn2p/Msn4p qui sont sous régulation notamment de la voie HOG. Cette voie de signalisation, en plus de son rôle bien connu dans l'adaptation aux stress osmotiques,

joue également chez de nombreux champignons un rôle dans la réponse aux stress oxydatifs. Nous disposons au laboratoire de mutants déficients pour la MAP kinase Hog1 chez *A. brassicicola*. L'étude du contenu en sucres solubles de telles souches cultivées en conditions standard ou soumises à différents stress osmotique permettrait de mieux caractériser le lien possible entre la voie de signalisation HOG et le métabolisme du mannitol.

En revanche l'accumulation de mannitol apparaît comme essentielle lors d'un stress matriciel généré par le PEG. L'ajout de PEG dans le milieu abaisse son potentiel hydrique provoquant un efflux d'eau du compartiment intracellulaire vers l'extérieur. Ce stress affecte la germination et la croissance de *F. graminearum*. Ce champignon s'y adapte en accumulant principalement du glycérol et de l'arabitol (Ramirez *et al.*, 2004). Chez *A. brassicicola* les mutants affectés dans la production et l'accumulation du mannitol sont sensibles au stress matriciel. Les mutants *AbΔmdh1* qui suraccumulent ce métabolite sont plus résistants que le génotype sauvage. Les fonctions alcools du mannitol lui conféreraient la capacité de mimer les molécules d'eau (Ruijter *et al.*, 2003). Cette propriété permettrait au mutant de survivre sur des semences à l'état sec. Une étude de leur capacité à se maintenir sur les semences pour des temps plus long (6 mois ou 1 an) mettrait en évidence l'implication du mannitol dans les mécanismes qui régissent la conservation d'*A. brassicicola* sur les graines.

Ces différentes données nous permettent de formuler l'hypothèse que le mannitol pourrait jouer le rôle d'un sucre de stockage lors du développement d'*A. brassicicola*. Lors des étapes de germination, d'élongation et de ramification des hyphes, le mannitol stocké dans les conidies serait remobilisé pour fournir à la cellule fongique une partie de l'énergie ou des ressources carbonées dont elle a besoin. Dans les phases plus matures de son développement, le mannitol est accumulé via la voie MPD-dépendante. *In planta*, il semblerait qu'il y ait dès les premiers jours de l'interaction une forte production de mannitol par les cellules fongiques expliquant ainsi la forte accumulation du polyol quatre jours après inoculation. Ces observations sont en corrélation avec l'hypothèse d'une remobilisation des hexoses végétaux en mannitol par certains champignons pathogènes avancée par Dulermo *et al.* (2010). Le mannitol fongique serait ensuite alors dégradé, probablement pour favoriser les étapes de conidiogénèse. Comme chez *A. niger* (Aguilar-Osorio *et al.*, 2009), l'importance cruciale de la MDH dans la production de conidies a été démontrée. Le métabolisme du mannitol intervient également dans les mécanismes de protection contre les stress oxydatifs notamment la présence de mannitol dans les jeunes hyphes participe à la tolérance du champignon aux ITC. Le mannitol semble ainsi avoir chez *A. brassicicola*, un double rôle potentiel ; d'une part lors du développement notamment dans la sporulation et d'autre part en tant que molécule impliquée dans les mécanismes de protection contre les stress oxydatifs.

## 2. Chapitre 1.b : Etude du transport du mannitol dans l'interaction *A. brassicicola* / Brassicacées



### 2.1.A. *A. brassicicola*, champignon sécréteur de mannitol

Au cours des expériences menées lors de l'étude du métabolisme du mannitol, il a été mis en évidence qu'*A. brassicicola* est capable de produire et d'accumuler du mannitol. L'hypothèse de travail présentée en début de chapitre suppose que l'agent pathogène pourrait également le sécréter afin de se prémunir du stress oxydatif extracellulaire généré lors de l'interaction avec une plante hôte. Pour vérifier si *A. brassicicola* comme *A. alternata* est sécréteur de mannitol, les sucres solubles présents dans son filtrat de culture ont été dosés par HPLC.

Des traces de mannitol sont détectées dans le filtrat des cultures témoins et en présence d'extrait de tomate. Lorsque le champignon est cultivé en présence d'extrait de radis, le mannitol est détecté en plus grande quantité (**figure 46**). Son absence dans les milieux de culture non-inoculés démontre l'origine fongique du polyol. *A. brassicicola* est donc capable de sécréter du mannitol, cette sécrétion est *a priori* induite par la présence d'effecteurs présents dans les extraits de plante hôte.

Ces résultats suggèrent qu'*A. brassicicola* possède un ou plusieurs transporteurs de mannitol qui assurent la fonction de sécrétion. Il n'existe pas de transporteur de polyol décrit chez les champignons filamenteux dans la littérature actuelle mais plusieurs ont été caractérisés chez des bactéries ou des végétaux. Chez *A. thaliana* six transporteurs putatifs de polyols de type MFS ont été identifiés (Klepek *et al.*, 2005), notamment AtPLT5 impliqué dans le transport de mannitol.

### 2.2. Recherche d'un transporteur de mannitol potentiel dans le génome d'*A. brassicicola*

La recherche par BLAST sur le génome d'*A. brassicicola* à partir de la séquence d'AtPLT5 a conduit à l'identification de nombreux candidats potentiels à la fonction de transporteur de polyols. Plusieurs autres recherches selon la même méthodologie à partir des autres transporteurs putatifs décrits chez *A. thaliana* (AtPLT1, 2, 3, 4 et 6) ont permis de sélectionner une ORF candidate qui présente, en moyenne, la plus forte homologie avec les six protéines végétales. Ce gène nommé *Abtp1*, situé dans le contig 9, présente ainsi 23% d'identité avec le transporteur de mannitol AtPLT5. L'analyse de la séquence protéique prédite révèle la présence de séquences consensus caractéristiques des MFS transporteurs de sucres (*voir figure 49*). La modélisation de la séquence protéique prédit une structure similaire à celle d'AtPLT5 avec 12 domaines transmembranaires (Klepek *et al.*, 2005) (**figure 47**). Une analyse phylogénétique basée sur l'alignement de diverses

séquences protéiques correspondant à des MFS transporteurs de sucres ou de polyols a été réalisée. Les transporteurs de mannitol ont pour la plupart été identifiés chez les bactéries et chez certaines plantes comme le transporteur AtPLT5 chez *A. thaliana* ou AgMaT1 et AgMaT2 chez le céleri (Noiraud *et al.*, 2001 ; Juchaux-Cachau *et al.*, 2007). D'un point de vue phylogénétique, le transporteur TP1 apparaît proche d'un transporteur de glucose identifié chez *S. cerevisiae*, et se rapproche d'une manière générale des transporteurs d'hexose identifiés chez les levures (**figure 48**). Ces résultats ne sont pas incohérents avec l'attribution d'une fonction putative de transporteur de mannitol pour *AbTP1*, la gamme de substrats pris en charge par les MFS est généralement assez large. AtPLT5 est par exemple impliqué dans le transport d'un grand nombre de molécules telles que les polyols mais aussi de divers hexoses et pentoses (Klepek *et al.*, 2005).

La première prédiction de la séquence codante du gène, nommée *Abtp1*, propose un ORF codant 1661 acides aminés interrompu par 3 introns. Le premier et le deuxième intron sont proches de l'ATG ; le troisième est localisé dans la partie 3' de la séquence. Une approche moléculaire a été utilisée pour valider ces prédictions *in silico*. Aucune forme présentant un épissage simultané des 3 introns n'a été observée. Régulièrement, des formes partiellement épissées où les introns 2 et 3 sont toujours présents, sont séquencées. Les introns semblent être épissés de manière indépendante. Ils présentent tous des codons stop en phase avec le cadre de lecture ouvert de la partie codante, ce qui laisse supposer une régulation par épissage alternatif. La validation de la présence d'intron n'a pu se faire seulement grâce à l'amplification de fragment d'ADNc à partir de jeux d'amorce encadrant spécifiquement l'intron cible. Les produits PCR ainsi obtenus et leur séquençage ont montré que les introns en première et deuxième position s'avèrent conformes aux prédictions bioinformatiques. Les résultats des séquençages révèlent une position décalée du troisième intron par rapport aux prédictions. Celui-ci ne présente alors plus les séquences consensus qui bordent les introns des champignons filamenteux. **La figure 49** montre l'ADNc théorique après épissage des trois introns. L'existence d'un codon d'initiation en phase, positionné après les deux premiers introns, et l'épissage atypique du troisième intron suggèrent qu'une protéine plus petite que celle prédite pourrait être synthétisée : AbTP1b. Cet ORF ne posséderait alors qu'un seul intron. La protéine théorique AbTP1t dont la traduction débute au premier ATG prédit, pour laquelle les trois introns seraient épissés et la protéine AbTP1b présentent toutes deux les séquences consensus des MFS qui sont notamment présentes chez AtPLT5 (**figure 50**). La protéine AbTP1b étant plus courte ne possède que 11 domaines transmembranaire contre 12 chez AbTP1a ou AtPLT5 (**figure 51**).

### 2.3. Expression du gène *Abtp1* in planta

Dans l'hypothèse d'une relation entre la sécrétion de mannitol et l'expression du pouvoir pathogène, l'expression de gènes liés au transport de ce polyol est probablement modulée en phase infectieuse. Le taux de transcrits du gène *Abtp1* a été évalué par RT-PCR quantitative au cours d'une cinétique d'infection sur choux révélant que le gène est très fortement exprimé lors de l'interaction (**figure 52**). Les taux d'induction particulièrement élevés sont fréquents pour les gènes codant des transporteurs lors de l'exposition des champignons à différents stress. Ce résultat suggère néanmoins que AbTP1 pourrait avoir un rôle dans la phase infectieuse d'*A. brassicicola*.

### 2.4. Expression hétérologue du gène *Abtp1* chez *Saccharomyces cerevisiae*

Pour tester l'hypothèse selon laquelle *Abtp1* code un transporteur de mannitol chez *A. brassicicola*, une stratégie d'expression hétérologue a été employée. Cette stratégie consiste à exprimer la protéine AbTP1 dans un organisme modèle qui ne produit ou ne transporte du mannitol. L'incorporation de mannitol radiomarqué ajouté au milieu de culture est ensuite dosée dans les cellules qui expriment AbTP1 et comparée à des témoins non expresseurs. La séquence codante du gène *Abtp1b* a ainsi été clonée dans le vecteur pYES2T qui permet l'expression du gène recombinant dans *S. cerevisiae*. Cette levure n'est pas connue pour métaboliser du mannitol (Quain and Boulton, 1987). Les levures ont été transformées avec le plasmide pYES2T vide qui constitue un témoin négatif de l'expérience ou avec le plasmide pYES2T/*Abtp1b*. Après culture en présence de mannitol radiomarqué, la radioactivité incorporée dans les cellules a été mesurée. Les résultats obtenus (non présentés) n'indiquent aucune différence significative dans les quantités de radioactivité incorporée entre la souche exprimant la protéine AbTP1b et la souche témoin transformée avec le plasmide vide.

### 2.5. Obtention et validation d'un mutant nul *AbΔtp1*

L'obtention du mutant nul dans le gène *Abtp1* a été réalisée selon la même méthodologie que les mutants du métabolisme du mannitol. Les candidats issus de la transformation ont été monospores deux fois successivement et vérifiés par PCR et Southern-blot (**figure 53**). Deux clones transformés sont conservés pour les tests de phénotypage.

### 2.6. Impact de la délétion du gène *Abtp1* sur le métabolisme des sucres

Si AbTP1 joue un rôle dans le transport de mannitol ou même d'un autre sucre lié au métabolisme du polyol, la perte de la protéine peut entraîner une modification de la composition glucidique cellulaire. L'impact de la mutation sur la proportion des sucres cellulaires majoritaires a été analysé dans un premier temps par RMN pour des colonies mycéliennes incubées 7 jours (Vogel +

2% glucose, 150 rpm, 24°C) (**figure 54**). Le signal spécifique du mannitol est détecté chez les mutants *AbΔtp1* cependant par rapport aux signaux spécifiques des autres sucres, il semble accumulé en moins grande quantité que chez la souche sauvage parentale pour cette condition de culture.

Pour quantifier cette différence, des dosages des sucres solubles par HPLC ont été réalisés dans les conidies seules, dans les jeunes hyphes 24h après germination (PDB, 150 rpm, 24°C) ou dans le matériel fongique issu d'une culture de 7 jours (Vogel + 2% glucose, 150 rpm, 24°C). Les résultats des dosages sur les conidies isolées d'*A. brassicicola* (**figure 55**) révèlent une différence significative de teneur en mannitol entre le génotype sauvage et les mutants *AbΔtp1*. La perte du gène entraîne une diminution du mannitol présent dans les organes de multiplication asexuée du champignon. Aucune différence significative de teneur en tréhalose dans les conidies seules n'est par contre observée (résultat non présenté). Après 24h de culture, la teneur en mannitol dans les jeunes hyphes de la souche mutante est légèrement supérieure à celle mesurée pour la souche sauvage. Sur des temps de culture plus importants (7 jours), la différence de teneur en mannitol mise en évidence par RMN est confirmée par HPLC. Dans ces conditions de cultures (mélange de conidies et de mycélium) les mutants *AbΔtp1* accumulent significativement moins de mannitol que le génotype sauvage. La teneur en tréhalose ne semble pas affectée dans ce cas par la délétion du gène *Abtp1* (non présenté).

## 2.7. Impact de la délétion du gène *Abtp1* sur la sécrétion de mannitol

*A. brassicicola* est un champignon sécréteur de mannitol. Cette sécrétion est stimulée par des molécules spécifiques aux plantes hôtes (voir figure 46). Le mannitol contenu dans les filtrats de culture d'*Ab43wt* et des mutants *AbΔtp1* a été dosé par HPLC en présence et en absence d'extrait de radis (**figure 56**). La stimulation de la sécrétion de mannitol par des effecteurs végétaux est reproduite. Les différences de quantités de mannitol retrouvées dans le filtrat des cultures d'*Ab43wt* et d'*AbΔtp1*, en présence ou en absence d'extraits de plante hôte ne sont pas significatives. Ces résultats suggèrent que *AbTP1* n'est pas un transporteur de mannitol ou qu'au moins un autre transporteur de mannitol fonctionnel existe chez *A. brassicicola*

## 2.8. Phénotypage des paramètres de croissance des mutants *Abtp1*

Les paramètres de croissance des mutants *AbΔtp1* ont été étudiés par néphélométrie en condition standard de culture (PDB, 150 rpm, 24°C) (**figure 57**). La période de latence avant la germination des conidies est légèrement plus courte chez *AbΔtp1* que chez *Ab43wt* mais la différence n'est pas significative. La vitesse maximale de croissance est identique pour les deux génotypes.

## 2.9. Réponses des mutants *Abtp1* aux stress oxydatifs

L'étude précédente sur des mutants du métabolisme du mannitol démontre que la perte des voies liées au métabolisme du mannitol atténue la tolérance aux stress oxydatifs d'*A. brassicicola*. La sensibilité aux stress oxydatifs des mutants *AbΔtp1* a été analysée par néphélométrie. Quatre conditions induisant un stress oxydatif ont été testées (**figure 58a et c**). En présence d' $H_2O_2$  à des concentrations élevées (1 mM), les mutants *AbΔtp1* s'avèrent plus sensibles que le génotype sauvage. Pour des concentrations plus faibles, les deux génotypes ont une tolérance équivalente. Nous nous sommes également intéressés à la réponse des mutants *AbΔtp1* aux AI-ITC. Ils présentent une tolérance légèrement plus élevée que le génotype sauvage (**figure 58b et c**).

### 2.10. Rôle d'*AbTP1* dans l'expression du pouvoir pathogène

Les expérimentations menées n'ont pas permis de déterminer la fonction précise de la protéine *AbTP1* notamment de vérifier son rôle potentiel de transporteur de mannitol. Cependant les mutants délétés dans le gène *Abtp1* présentent un phénotype différent du génotype sauvage face à certains stress, notamment une sensibilité accrue à l' $H_2O_2$  qui pourrait avoir des répercussions sur leur pouvoir pathogène. La virulence, l'agressivité ou la capacité à produire des spores *in planta* ont été évalués pour ce mutant.

- Virulence, agressivité et sporulation des mutants *AbΔtp1* sur chou (*Brassica oleracea*)

Des suspensions de concentrations graduelles en conidies ( $10^5$ ,  $10^4$  et  $10^3$  conidies/ml) d'*Ab43wt* et des mutants *AbΔtp1* ont été inoculées en parallèle sur feuilles de choux. Après 6 jours d'incubation, il apparaît que les mutants *AbΔtp1* sont toujours capables de provoquer une nécrose de même gravité que celle produite par le génotype sauvage (**figure 59**). Le gène *TP1* ne semble pas une composante essentielle de la virulence chez *A. brassicicola*. De plus la diminution de la pression parasitaire n'affecte en rien l'agressivité des mutants par rapport au génotype sauvage. Ces derniers semblent même légèrement plus agressifs qu'*Ab43wt* lorsqu'ils sont inoculés à faibles pressions parasitaires ( $10^3$  conidies/ml). Enfin, les mutants sont autant capables que le génotype sauvage de produire des conidies en grand nombre dans la zone nécrosée (**figure 60**).

## 2.11. Synthèse et discussion des résultats

(Le **tableau 4** rassemble les principaux résultats.)

Comme nous l'avons montré dans la première partie de ce chapitre, le rôle du mannitol dans le processus infectieux ne semble pas être essentiel à la virulence, néanmoins la perturbation de ses voies métaboliques affecte l'agressivité d'*A. brassicicola* et sa capacité à sporuler *in planta*. Jennings *et al.* (1998) ont mis en évidence que la sécrétion de mannitol est fortement induite chez *A. alternata* en présence d'extraits de feuille de tabac. Ces résultats ont été reproduits chez *A. brassicicola* en présence d'extrait de chou suggérant que comme *A. alternata*, il s'agit d'une espèce sécrétrice de mannitol. La quantité de mannitol détectée dans le filtrat de culture en présence d'extrait de plante hôte largement supérieure à celle retrouvée dans les filtrats de culture non supplémentés ou supplémentés en extrait de plante non-hôte (tomate) semble indiquer que des molécules d'origine végétale, spécifiques de la plante hôte, induisent sa sécrétion. La nature de ces effecteurs n'est cependant pas connue à ce jour. On ne peut toutefois pas totalement écarter l'hypothèse que les relativement faibles quantités de mannitol détectées dans les filtrats de cultures pourraient provenir d'une lyse de certaines cellules fongiques plutôt que d'une sécrétion active.

Pour mesurer de façon directe l'importance de la sécrétion de mannitol fongique dans le pouvoir pathogène des champignons, l'étude du comportement de mutants déficients pour cette fonction a été envisagée dans le cadre de cette thèse. Cependant lorsque notre étude a débuté, les seules protéines eucaryotiques connues assurant le transport de ce polyol appartenaient principalement au règne végétal, comme par exemple AtPLT5 caractérisée chez *A. thaliana* (Lemoine *et al.*, 2001), et aucun transporteur de polyol n'avait encore été identifié chez les champignons filamenteux. Le gène *Abtp1* a été sélectionné parmi plusieurs candidats sur les bases d'homologies avec les autres transporteurs de polyols putatifs décrits chez *A. thaliana* (AtPLT1, AtPLT2, AtPLT3, AtPLT4, et AtPLT6) (Klepek *et al.*, 2005) et la présence de séquences consensus des transporteurs de la famille MFS spécialisés dans le transport de sucres.

Les résultats de caractérisation de la séquence codante du gène *Abtp1* suggèrent une régulation post-transcriptionnelle du gène par épissage alternatif (**figure 61**). Le gène *Abtp1* peut donner lieu à deux protéines putatives. La forme fonctionnelle est encore inconnue. Le séquençage du pool de transcrits *Abtp1* extraits *in planta* dans des conditions où le gène est surexprimé permettrait de déterminer la forme épissée majoritaire.

Lors de l'expression hétérologue du gène dans la levure, seule la séquence débutant au deuxième ATG prédit a été clonée dans le vecteur d'expression. L'absence de mannitol radiomarqué incorporé dans les cellules de levure exprimant AbTP1b peut donner lieu à diverses interprétations.



En effet pour que ce type d'expérience soit un succès, la protéine exprimée doit être fonctionnelle, adressée à la membrane et capable d'assurer un transport de mannitol du milieu extérieur vers le cytoplasme. Il est donc possible que la protéine AbTP1b ne corresponde pas à la forme fonctionnelle ou que l'adressage à la membrane plasmique n'ait pas eu lieu correctement. De plus, le transporteur *AbTP1* pourrait assurer le transfert de polyol entre les différents compartiments cellulaires ou correspondre à un transporteur n'assurant que l'export. Toutefois le résultat de cette expérience suggère avant tout que ce gène ne code pas un transporteur spécifique de mannitol. Cette hypothèse est confirmée par la caractérisation fonctionnelle d'AbTP1 par génétique inverse. L'intégralité de la séquence génomique comprise entre le premier ATG prédit jusqu'au codon stop a été remplacée par mutagenèse dirigée. Le mannitol sécrété dans les filtrats de culture par les mutants *AbΔtp1* en présence ou en absence d'extraits de *Brassicacées* n'est pas significativement différent du génotype sauvage. AbTP1 ne semble pas être un transporteur impliqué dans la sécrétion du mannitol. La perte de la protéine AbTP1 influence toutefois la concentration en mannitol tout au long du cycle de développement d'*A.brassicicola*. Les métabolismes des différents sucres étant fortement interconnectés, il est possible qu'AbTP1 influe sur la concentration en mannitol de manière indirecte.

Le transporteur putatif AbTP1 d'*A. brassicicola* est phylogénétiquement éloigné des transporteurs de mannitol décrits chez les végétaux *A. thaliana* ou *Apium graveolens*. Cette distance phylogénétique peut s'expliquer par l'éloignement évolutif entre les champignons et les végétaux. La possibilité qu'AbTP1 soit un transporteur de glucose ne peut pas être exclue. Il est également possible que le transporteur potentiel n'ait pas de spécificité absolue pour son substrat et qu'il puisse interagir avec plusieurs sucres ou polyols dont le mannitol.

Dans le cadre de la recherche de transporteurs de mannitol et de leur implication dans le processus infectieux, la même démarche expérimentale pourrait être appliquée aux homologues chez *A. brassicicola* de transporteurs putatifs de polyols récemment caractérisés *in silico* chez *B. cinerea* (Afoufa-Bastien, 2010). Leurs homologues chez *A. brassicicola* sont respectivement AB09406 et AB01052. Les alignements de la séquence protéique prédite d'AbTP1 avec ces deux dernières séquences génèrent des scores d'homologie très faibles dans les deux cas (autour de 23%). Un BLAST P de la séquence protéique prédite d'AbTP1 sur le protéome potentiel de *B. cinerea* révèle que les plus proches homologues du transporteur d'*A. brassicicola* sont des high-affinity glucose transporteurs de type ght1 (BCG1G10092 et BCG1G09068) ou de type RGT2 (BCG1G0311 et BCG1G09891).

Outre un rôle dans les mécanismes de protection contre les défenses chimiques des plantes hôtes, les transporteurs de sucres pourraient également intervenir durant la phase infectieuse pour détourner les ressources carbonées des végétaux. Cette hypothèse soutenue dans la publication de Dulermo *et al.* (2009) stipule que le champignon *B. cinerae* pourrait convertir les hexoses végétaux en mannitol non assimilable par la plante. Des transporteurs fongiques spécialisés pourraient alors être impliqués dans l'import de sucres végétaux lors de l'interaction. Pour tester si AbTP1 est candidat à cette fonction, les sucres végétaux radiomarqués incorporés au mycélium des mutants ou du sauvage lors de l'interaction pourraient être dosés et comparés.

### 3. Conclusion intégrative sur le rôle du métabolisme du mannitol dans le pouvoir pathogène



*A. brassicicola* compte parmi les facteurs qui composent son pouvoir pathogène, des mécanismes de protection contre les défenses de la plante hôte notamment celles à l'origine d'un stress oxydatif. La présente étude a montré que le métabolisme du mannitol joue un rôle non négligeable dans la réponse adaptative à ce type de stress. Sa présence en proportion suffisante est essentielle à la tolérance des conidies aux dommages cellulaires causés par les FAO extracellulaires par exemple celles générées lors du *burst* oxydatif dans les premières phases de l'interaction. La voie MPD-dépendante voie strictement productrice de mannitol, est impliquée dans la tolérance aux stress oxydatifs intracellulaires en particulier ceux générés par les AI-ITC à des doses potentiellement compatibles avec celles rencontrées *in planta*. Une partie de la résistance *in planta* d'*A. brassicicola* aux produits de dégradation des glucosinolates pourraient alors s'expliquer par le quenching des FAO produites par le mannitol accumulé dans les jeunes hyphes. L'hypersensibilité des mutants du métabolisme du mannitol ou des mutants *AbΔtp1* n'affecte pas leur virulence. Il en est de même pour la sensibilité aux ITC de certains génotypes. L'effet des stress oxydatifs ne semble pas létal pour *A. brassicicola* mais conditionne son agressivité *in planta*. La seule implication du mannitol dans la réponse adaptative au stress oxydatif intracellulaire ne suffit toutefois pas à expliquer la tolérance d'*A. brassicicola* aux ITC. Le champignon possède très probablement d'autres mécanismes de protection notamment agissant directement par détoxication ces molécules.

Le mannitol apparaît dans la physiologie d'*A. brassicicola* comme une source de carbone stockée, remobilisée pour la germination ou la tolérance à certains stress et nécessaire à la conidiogénèse. Son métabolisme est en lien avec celui d'autres sucres comme notamment le tréhalose. Le devenir, dans la cellule fongique, de carbones radiomarqués initialement incorporés au mannitol pourrait permettre d'identifier les composés issus de la remobilisation du polyol chez les différents génotypes et en condition de stress ou *in planta*. La nature des liens entre les deux métabolismes pourrait être renforcée par l'analyse du profil des sucres solubles de mutants délétés dans les gènes clefs du métabolisme du tréhalose.

Le mannitol semble jouer dans la protection contre les défenses de l'hôte un rôle non essentiel pour la virulence mais indispensable pour la dissémination du champignon qui est une composante cruciale du cycle de vie d'*A. brassicicola*. L'inhibition de la MDH fongique à l'apparition des premiers symptômes d'alternariose permettrait d'enrayer la sporulation et ainsi la propagation de la maladie.

#### 4. Résultats complémentaires : Importance de transporteurs de mannitol d'*A. thaliana* dans la tolérance à *A. brassicicola*



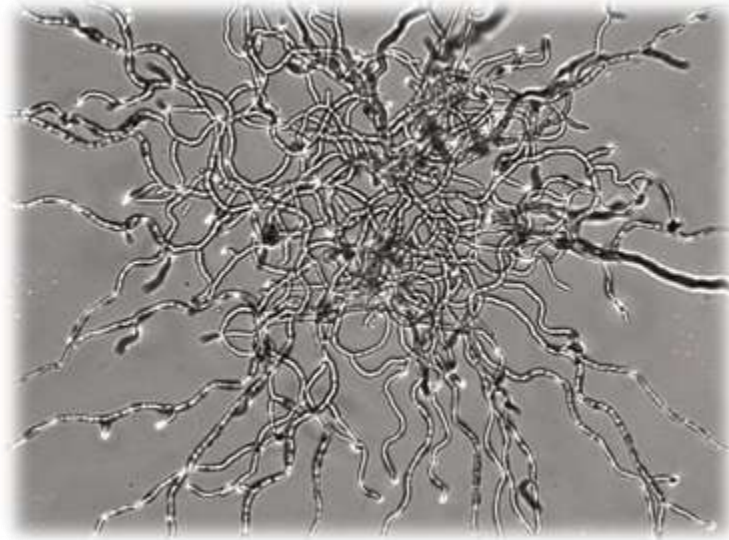
Le transport du mannitol fongique peut également être un facteur de résistance des plantes hôtes aux champignons producteur et sécréteur de mannitol comme *A. brassicicola*. La surexpression chez le tabac d'un transporteur de polyol de céleri a par exemple permis d'augmenter la résistance des plantes vis à vis d'*Alternaria longipes* (Jucheaux-Cachau *et al.*, 2007). Les travaux de Jennings *et al.* (2002) ont montré l'importance d'une MDH végétale dans la résistance du tabac au champignon sécréteur de mannitol *A. alternata*. La présence de cette enzyme chez des plantes non productrices de mannitol suggère un rôle de PR protéine. Ce mécanisme de défense suppose la présence de transporteurs impliqués dans l'acheminement du polyol fongique produits dans les espaces intercellulaires vers les MDH végétales dont la localisation est intracellulaire. Dans ce contexte, la délétion de gène codant un transporteur de mannitol pourrait rendre inaccessible le mannitol fongique à la MDH végétale et aurait un impact sur la sensibilité de la plante au pathogène. Cette hypothèse a été testée dans le pathosystème *A. brassicicola* / *A. thaliana*.

Grâce à la collaboration avec le laboratoire PHYMOTS (Poitiers), nous disposons de plusieurs génotypes d'*A. thaliana* déficient en transporteur de polyols. Les trois mutants d'*A. thaliana* présentent respectivement une délétion complète du gène codant AtPLT5, du gène codant AtPLT6 et du promoteur du gène codant AtPLT4 codant tous trois pour des transporteur de polyol (Klepek *et al.*, 2005). Le niveau de sensibilité à *A. brassicicola* de ces génotypes d'*A. thaliana* a été évalué et comparé à l'écotype sauvage d'*A. thaliana* : *col-0* (figures 62 et 63).

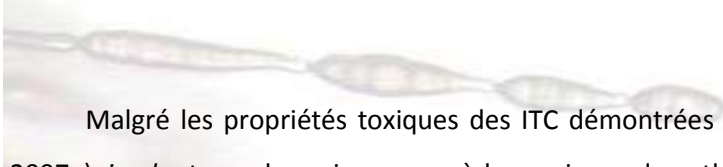
L'écotype *col-0* est connu pour son importante tolérance à *A. brassicicola* (Mukherjee *et al.*, 2009 et 2010). Les différences d'agressivité sont difficiles à percevoir dans un tel pathosystème. Il est de plus fréquent que l'inoculum même à forte concentration ne provoque pas de symptôme. Par génotype, la totalité des feuilles ayant développé une nécrose évolutive sont comptabilisées. Le génotype sauvage *col-0* présente globalement moins de feuilles atteintes (40% environ) que les mutants (65% en moyenne). Lorsque l'agressivité d'*A. brassicicola* est mesurée sur chacun des quatre génotypes, aucune différence significative d'importance de symptôme n'est observée. Cependant l'importance des écarts-types rend difficile toute interprétation statistique. La perte d'un unique transporteur de mannitol ne provoquerait probablement pas un phénotype suffisamment marqué étant donné la redondance fonctionnelle probable des transporteurs codés par ces gènes.

L'importance du mannitol dans le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* dans un tel pathosystème est peut-être secondaire. Le stress oxydatif notamment celui généré par les ITC est probablement faible comparé à la forte toxicité de la camalexine contenue en grande quantité dans les feuilles d'*A. thaliana*. Il serait intéressant de reproduire cette expérience dans un autre pathosystème ou en utilisant des génotypes d'*A. thaliana* déficients en transporteurs générés à partir du mutant *pad3* non producteur de camalexine.

## **Chapitre 2 : Etude de mécanismes de détoxification des isothiocyanates, composés de défense des Brassicacées, chez *A. brassicicola***



## Chapitre 2 : Etude de mécanismes de détoxification des isothiocyanates, chez *A. brassicicola*



Malgré les propriétés toxiques des ITC démontrées *in vitro* sur *A. brassicicola* (Sellam *et al.*, 2007a), *in planta* ce champignon possède un niveau de pathogénie élevé. Cette constatation suppose que lors de l'interaction, le pathogène est capable de mettre en place des mécanismes de protection qui minimisent la charge fongitoxique des ITC. Le premier chapitre de cette thèse argumente en faveur d'un mécanisme de protection indirect visant à atténuer le stress oxydatif généré par les ITC. Dans ce chapitre nous nous focaliserons sur des mécanismes agissant directement sur les ITC. Les stratégies fongiques qui peuvent être potentiellement mises en place sont soit leur dégradation enzymatique, par exemple via une cyanide hydratase comme cela a été évoqué par Sexton et Howlett (2000), soit un mécanisme non dégradateur par un efflux vers le milieu extérieur ou une séquestration vacuolaire des ITC libres ou encore leur conjugaison au glutathion via des GST. Le complexe ainsi formé pourrait alors également être séquestré dans la vacuole ou excrété (**figure 64**). Cette stratégie a déjà été démontrée dans le cas de plusieurs xénobiotiques notamment chez *B. cinerea* (Prins *et al.*, 2000) ou *M. persicae* (Francis *et al.*, 2005). De plus dans certains cas, la conjugaison au glutathion diminue la charge toxique du xénobiotique (Prins *et al.*, 2000). Cette dernière hypothèse est testée dans le pathosystème *A. brassicicola* / Brassicacées.

### 1. Etude transcriptomique de la réponse à l'exposition aux ITC chez *S. cerevisiae*

Cette étude a pour but d'identifier des marqueurs spécifiques consensus de la réponse adaptative des champignons aux ITC. Le transcriptome du champignon modèle *S. cerevisiae* face à la charge toxique des ITC a été analysée par une méthode sans *a priori*. Cette analyse globale du transcriptome a été faite en collaboration avec Adnane Sellam du CNRC (Conseil national de recherche Canada/McGill university). Des ARN de levures cultivées en présence d'ITC à des doses sub-létales (0,5 et 1 mM) ainsi qu'en condition témoin ont été extraits. Leur intégrité ayant été vérifiée par électrophorèse, les ARN ont été rétrotranscrits puis hybridés sur puces à ADN.

Les résultats préliminaires de cette analyse sont cohérents avec ceux obtenus par hybridation soustractive chez *A. brassicicola* en présence d'ITC (Sellam *et al.*, 2007). Le profil transcriptomique de la levure en présence d'Al-ITC semble également caractéristique d'une réponse à une situation de stress oxydatif. Une stimulation du métabolisme de la cystéine et de la glutamine est également observée ainsi qu'une inhibition du cycle cellulaire. De même des gènes clefs du cycle du Glutathion semblent activés comme la GSH peroxydase, la GSH oxidoreductase ou les GSH synthase. L'induction

par les ITC de gènes codant des GST suggère que ces protéines sont probablement sollicitées dans la réponse protectrice de *S. cerevisiae* comme cela avait été observé chez *A. brassicicola* (Sellam et al., 2006, 2007) (**figure 65**).

## **2. Caractérisation de gènes codant des GST potentiellement impliquées dans la réponse aux ITC chez *A. brassicicola***

L'hypothèse de l'implication des GST dans les mécanismes de protection contre les ITC chez *A. brassicicola* est étayée par des études préliminaires sur le transcriptome du champignon cultivé en présence de ce xénobiotique (Sellam *et al.*, 2006, 2007). Les résultats de ces études ont mis en évidence que 6 parmi les 22 GST putatives du génome d'*A. brassicicola* étaient surexprimées en présence d'AI-ITC.

L'une de ces GST, identifiée par DDRT-PCR, AbGST1, a plus particulièrement été étudiée. Sa caractérisation a fait l'objet d'une publication. Parmi les résultats présentés, la caractérisation de la protéine produite sous forme recombinante chez *E. coli* a montré que les substrats privilégiés de cette GST sont les ITC (Sellam *et al.*, 2006). De plus la bactérie recombinante surexprimant AbGST1 montre une tolérance particulière à ce xénobiotique (Sellam, manuscrit de thèse, 2007). D'autre part, cinq EST codant des GST potentielles ont été identifiées lors de l'analyse de la banque SSH générée à partir de conidies en cours de germination exposées aux ITC (Sellam *et al.*, 2007). Ces dernières n'avaient par contre fait l'objet d'aucune caractérisation.

Les régions impliquées dans la synthèse des transcrits des cinq GST isolées par SSH (Sellam et al. 2007) ont été recherchées dans le génome d'*A. brassicicola*. La localisation des ORF correspondant et des éventuels introns a été réalisée manuellement. Ainsi la protéine AbGST2, correspondant à l'EST A2H5, est constituée de 154 résidus et est codée par un gène ne contenant pas d'intron ; la protéine AbGST3, correspondant à l'EST A1F1, est constituée de 228 résidus et est codée par un gène contenant un seul intron de 64 nt ; la protéine AbGST4, correspondant à l'EST A2C1, est constituée de 257 résidus et est codée par un gène contenant un intron de 46 nt ; la protéine AbGST5, correspondant à l'EST A2C10, est constituée de 267 résidus et est codée par un gène contenant un intron de 64 nt ; et la protéine AbGST6, correspondant à l'EST A4D12, est constituée de 243 résidus et est codée par un gène interrompu par deux introns de respectivement 54 et 57 nt. Pour rappel la protéine AbGST1 (AY987487) est codée par un gène de 1068 nt interrompu par 3 introns de 92, 145 et 53 nt (Sellam *et al.*, 2006) (**tableau 5**).



Les séquences protéiques complètes déduites ont été comparées à un jeu de séquences de GST fongiques correspondant aux différents groupes définis notamment par Mc Goldrick *et al.* (2005), Bresell *et al.* (2005), Garcera *et al.* (2006) et Morel *et al.* (2009). L'analyse phylogénétique des six GST montre qu'elles se répartissent dans cinq familles de GST différentes (**figure 66**). Un alignement des séquences protéiques AbGST1, 2 et 5 avec des GST caractéristiques des *clusters 1 et 2* permet de mettre en évidence les séquences signatures qui différencient les deux clusters, plaçant AbGST1 et 2 dans le *cluster 1* et AbGST5 dans le *cluster 2* (**figure 67**). Le *Cluster 1* est constitué de deux sous-ensembles non-monophylétiques où sont respectivement classées AbGST1 et AbGST2. Il associe notamment les deux GST putatives d'*A. brassicicola* à la GST3 caractérisée chez *S. pombe* (Veal *et al.*, 2002) ou GTT1 chez *S. cerevisiae* (Mariani *et al.*, 2008) impliquées toutes les deux dans la tolérance au stress oxydatif et la détoxification de molécules toxiques. La GTT1 a notamment été caractérisée par Morel *et al.* (2009) qui lui accordent une activité de conjugaison du glutathion aux xénobiotiques et une fonction cruciale dans la réponse au stress généré par l' $H_2O_2$ . Le *Cluster 2* regroupe AbGST5 avec notamment GSTA caractérisée chez *A. nidulans* qui joue un rôle dans la résistance à divers xénobiotiques ou la tolérance aux métaux lourds (Fraser *et al.*, 2002) (**figure 67**).

Sur la base des motifs spécifiques et du profil d'hydrophobie, AbGST4 appartient à la famille MAPEG (sous-famille MGST3) (**figure 68**). Le plus proche homologue décrit à ce jour de cette AbGST est une GST caractérisée chez l'Homme (HsNP665735) même si des orthologues à AbGST4 existent dans les génomes fongiques séquencés. Les protéines de cette catégorie sont décrites comme associées au micrososome. A partir de la séquence protéique, les logiciels *Target P* et *BaCeLLO* ont prédit qu'AbGST4 serait potentiellement sécrétée comme cela est fréquent chez les GST appartenant à cette famille. Les GST de la classe MAPEG possèdent de manière générale une activité glutathion peroxydase et sont impliquées dans des mécanismes de détoxification (Bresell *et al.*, 2005).

AbGST3 est classée parmi la famille *Omega* (**figure 69**), une catégorie de GST qui n'a que récemment été caractérisée chez les champignons notamment chez *Phanerochaete chrysosporium* (Morel *et al.*, 2009). Plus précisément AbGST3 est proche des GST de la sous-famille II qui ne comprend aucun homologue chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* ou *C. albicans* contrairement à la sous-famille I qui a, ainsi, été plus particulièrement étudiée. Néanmoins les enzymes de cette classe semblent posséder une activité de conjugaison du glutathion ou de dissociation du glutathion pour des molécules préalablement conjuguées (Morel *et al.*, 2009).

La famille *GTE* dont fait partie AbGST6 (**figure 70**) est une nouvelle classe créée par Morel *et al.* (2009). Les protéines qui la composent semblent n'avoir qu'une très faible activité de conjugaison du glutathion au CDNB. Cette famille semble assez répandue chez les champignons filamenteux comme

*Aspergillus* spp, *Fusarium* spp ou *B. cinerea*. Les auteurs suggèrent pour les GST de la famille GTE un rôle dans le retraitement des nutriments, la dégradation de la matière organique ou de xénobiotique en lien avec les phases infectieuses des champignons. Cependant aucune analyse fonctionnelle de telles enzymes n'a encore été menée.

Pour résumer, AbGST1 et 2 appartiennent au *cluster 1*, AbGST5 au *cluster 2*, AbGST3 est classée parmi la famille *Omega*, AbGST4 parmi les MAPEG et l'AbGST6 fait partie de la famille GTE. L'analyse des séquences protéiques prévoit pour AbGST1, 2, 3 et 5 une localisation cytosolique, AbGST4 serait potentiellement sécrétée et, AbGST6 serait, elle, présente au niveau des mitochondries.

### 2.1. Expression des gènes codant les GST

Le niveau d'expression des gènes codant les six GST sélectionnées a été évalué dans un premier temps au cours de cinétiques d'exposition aux ITC puis également au cours d'une cinétique *in planta* (*Brassica oleracea*).

- Niveaux d'expression des gènes *Abgst* lors de cinétiques d'exposition aux ITC

Les GST à l'étude ont été sélectionnées selon deux techniques d'analyse transcriptomique sans *a priori*. La DD-RT-PCR qui a permis l'isolement d'AbGST1 évaluait la réponse à une exposition aux Bz-ITC à une dose sub-létale (300  $\mu$ M) pendant 0,5h. La banque SSH dont sont issues les cinq autres AbGST a été réalisée à partir d'une exposition aux Al-ITC à une dose sub-létale (2,5 mM) pendant 0,5h. Au cours de cette étude, leur induction en réponse aux deux formes d'ITC a été vérifiée par RT-qPCR lors de cinétiques d'expositions *in vitro*. Le champignon a été exposé aux mêmes concentrations sub-létales utilisées pour la DD-RT-PCR et la construction de la banque SSH. Des temps d'exposition courts ont été choisis (30 minutes, 2 heures, 4 heures) afin d'établir une possible hiérarchie entre les différentes GST lors d'une réponse adaptative précoce.

Pour chacune des deux cinétiques, l'expression des gènes codant les GST sélectionnées est induite. Les niveaux d'induction varient cependant selon la forme d'ITC en présence, du temps d'exposition ou d'une GST à l'autre. A l'exception du gène *AbGst1* qui apparait comme étant le moins induit des six GST, tous les gènes sont fortement surexprimés en présence d'ITC. Les gènes codant les AbGST5 et AbGST6 semblent particulièrement sur-exprimés en présence d'Al-ITC (**figure 71a**) alors que le gène codant la AbGST2 est le plus fortement transcrit en présence de Bz-ITC (**figure 71b**). Ces phénomènes d'induction sont observés dès 30 minutes d'exposition et dans certains cas s'amplifient au cours du temps.

- Niveaux d'expression des gènes *Abgst* lors d'une cinétique d'infection sur chou

Dans le but d'évaluer l'implication potentielle de chacune des GST dans le déterminisme du pouvoir pathogène d'*A. brassicicola*, le niveau d'expression des gènes codant ces GST a été suivi par PCR quantitative au cours d'une cinétique *in planta* (*Brassica oleracea*) (**figure 72**).

Au cours de cette cinétique d'expression *in planta*, les gènes codant les six GST semblent être tous être sur-exprimés par rapport à la condition de culture *in vitro*. L'importance de l'induction varie selon les GST testées. Le gène codant la AbGST2 est le plus fortement induit et ce très précocement dès les premiers jours après inoculation. Cependant pour la plupart des GST le taux maximum d'expression dans notre cinétique est atteint à 6 jours après inoculation. Ce pic d'expression relative est particulièrement notable pour les gènes codant les AbGST2, AbGST4 et AbGST5. Le gène codant la AbGST1 qui avait été caractérisé par Sellam *et al.* (2007) comme étant surexprimé *in planta*, présente une induction moindre par rapport aux cinq autres gènes, mais son niveau d'expression relative reste tout de même supérieur à celui de la condition témoin. Globalement, l'induction de la transcription des gènes sélectionnés intervient très rapidement au cours de l'infection et reste élevée tout au long de l'interaction. Ces résultats de RT-qPCR *in planta* sont cohérents avec une possible implication de ces GST lors de la phase infectieuse sur la plante hôte. Ces profils d'expression sont aussi cohérents avec l'hypothèse de l'implication des GST dans un mécanisme de détoxification *in planta* des ITC. Ils suggèrent cependant une probable redondance fonctionnelle chez ces gènes.

## 2.2. Mutagenèse dirigée chez *A. brassicicola* : création de mutants nuls dans les gènes codant les GST potentiellement impliquées dans la réponse aux ITC

Une stratégie de génétique inverse a été adoptée pour caractériser fonctionnellement les six enzymes sélectionnées. Par recombinaison homologue les gènes codant les AbGST1 à 6 ont été soit éteints soit remplacés par un marqueur de mutation. La méthodologie employée est identique à celle utilisée pour la création des mutants du métabolisme du mannitol (chapitre 1). Six simples mutants ont été créés à partir de cassettes de disruption conférant une résistance à l'antifongique hygromycin B. Les mutants potentiels sont sélectionnés et monospores sur milieu complémenté en hygromycin B puis l'insertion spécifique de la cassette de mutation et l'absence d'ORF du gène natif sont vérifiés par PCR conventionnelle. Par génotype, deux lignées clonales indépendantes sont conservées pour réaliser les différents tests phénotypiques. Les mutants *AbΔgst1* et *AbΔgst2* ont été vérifiés par PCR conventionnelle et par Southern-blot ; les mutants *AbΔgst3*, *AbΔgst4*, *AbΔgst5* et *AbΔgst6* n'ont pour le moment été seulement vérifiés que par PCR conventionnelle.

- Vérifications des mutants
  - Par Southern-blotting des mutants *AbΔgst1* et *AbΔgst2*

La sonde utilisée est spécifique de la région cible de la cassette de mutation. La validation de l'insertion se fait par la mesure d'une différence de taille entre les signaux spécifiques du génotype sauvage et du génotype transformé. Cette différence de taille observée et la présence des signaux aux tailles attendues attestent de l'insertion de la cassette dans la région ciblée du génome. L'absence de signaux supplémentaires à des tailles non anticipées prouve qu'il n'y a pas eu d'insertion aléatoire dans une région non ciblée du génome d'*A. brassicicola*. Cette vérification a été réalisée sur les mutants *AbΔgst1* et *AbΔgst2* et confirme l'intégration d'une seule copie de la cassette de mutation au locus ciblé (**figure 73**).

- Par PCR conventionnelle des mutants *AbΔgst3*, *AbΔgst4*, *AbΔgst5* et *AbΔgst6*

La vérification par PCR a été réalisée selon les mêmes principes qu'au chapitre précédent (voir chapitre 1, sous-partie 1.5 page 49). Les couples d'amorces Hph1/Hph2 permettent de vérifier la présence du gène *Hph* qui confère la résistance à l'hygromycine B ; les couples FP1/RP1 encadrent la région cible de la recombinaison homologue, une différence de taille entre les produits d'amplification générés à partir du génome d'*Ab43wt* et les produits d'amplification générés à partir du génome des mutants prouve l'insertion de la cassette de mutation ainsi que l'absence de noyaux sauvage dans les colonies des souches mutantes. Les couples FP1/ HPh2 permette de vérifier que la différence de taille observée avec le couple d'amorce précédent est spécifiquement due à l'insertion du gène *Hph* à la place du gène cible. Ces divers tests PCR ont été réalisés avec succès pour chacune des lignées clonales des 6 mutants *AbΔgst* réalisés (**Figure 74**).

### 2.3. Sensibilité des mutants *AbΔgst* face aux ITC

L'hypothèse de départ stipule que les GST pourraient être impliquées dans les mécanismes de protection fongique contre les ITC. Afin de vérifier cette hypothèse et hiérarchiser leur spécificité face à ce xénobiotique, la croissance des mutants *AbΔgst<sub>x</sub>* est analysée par néphélométrie en présence d'Al-ITC (**figure 75**). Les mutants testés présentent presque tous une sensibilité accrue aux Al-ITC ; seuls les génotypes *AbΔgst2* ont une tolérance similaire au génotype de référence. La croissance des mutants *AbΔgst1*, *AbΔgst3*, *AbΔgst4*, *AbΔgst5* et *AbΔgst6* est très affectée par la présence d'Al-ITC. La germination des conidies de ces génotypes n'est pas totalement inhibée mais les phases de latence sont significativement plus grandes que pour le génotype sauvage dans les mêmes conditions. Les vitesses maximales de croissance sont également affectées. L'analyse des courbes néphélométriques permet de hiérarchiser l'importance de ces AbGST dans les mécanismes

de protection contre les AI-ITC. La perte des AbGST3, 5 et 6 affecte très fortement la tolérance aux dérivés des glucosinolates. Comparativement les *AbΔgst1* et *AbΔgst4*, bien que très sensibles ne présentent pas une inhibition totale de leur croissance en présence d'AI-ITC à des concentrations potentiellement rencontrée *in planta*. Les mutants *AbΔgst2* sont les seuls parmi le pool testé à ne pas présenter de sensibilité accrue.

#### 2.4. Sensibilité des mutants *AbΔgst* face à la phytoalexine brassinine

Le pathosystème *A. brassicicola* / chou (*Brassica oleracea*) sert de support notre étude sur le rôle supposé des GST dans le pouvoir pathogène. Parmi les défenses chimiques produites par le chou, la brassinine peut également générer un stress oxydatifs chez la cellule fongique (voir synthèse et discussion des résultats du chapitre 1a, page 63). Le spectre de substrat des GST est connu pour être assez large. Les GST pourrait être ainsi également impliquées dans la détoxification de cette phytoalexine. La sensibilité des mutants *AbΔgst<sub>x</sub>* face à la brassinine a été testée par néphélométrie (**figure 76**). De manière générale les 6 mutants testés présentent une sensibilité à la brassinine significativement plus élevée que le génotype sauvage. Cette différence de tolérance est plus ou moins prononcée selon le génotype. La croissance des mutants *AbΔgst1* et *AbΔgst3* est totalement inhibé en présence de 100 μM de brassinine, concentration qui n'inhibe que 70% de la croissance du sauvage. Les quatre autres mutants ont une sensibilité intermédiaire entre le génotype sauvage et les mutants *AbΔgst1* et *AbΔgst3*. Leur phénotype n'est pas significativement différent du génotype sauvage lorsque la brassinine est présente à 50 μM. Lorsque la Brassinine est supplémenté dans le milieu de culture à hauteur de 100 μM, les mutants *AbΔgst2*, *AbΔgst4*, *AbΔgst5* et *AbΔgst6* sont significativement plus sensibles qu'*Ab43wt*. Ces concentrations sont cohérentes avec celles que le champignon peut potentiellement rencontrer *in planta* (Pedras *et al.*, 2009).

#### 2.5. Activités de conjugaison au glutathion des GST totales de différents génotypes d'*A. brassicicola*

Les GST catalysent la conjugaison de composés lipophiles au glutathion les rendant ainsi hydrosolubles. Le complexe ainsi formé peut réduire la charge fongitoxique d'une molécule ou permettre sa séquestration ou sécrétion dans le milieu extérieur. Lors de la caractérisation de *AbGST1*, il a été démontré que cette enzyme pouvait utiliser les Bz-ITC comme substrat privilégié (Sellam *et al.*, 2007). Dans notre étude, cinq autres GST ont été sélectionnées sur la base de leur surexpression en présence d'ITC et *in planta*. L'approche par génétique inverse a montré que les mutants dans les gènes codant respectivement les six GST présentent une sensibilité accrue aux AI-ITC et/ou à la brassinine. Ces résultats étayent l'hypothèse que les GST pourraient être impliquées dans la détoxification des défenses chimiques des *Brassicacées*. Pour chaque génotype, les activités de

conjugaison du glutathion de l'ensemble des GST contenues dans un extrait protéique total ont été testées en présence de plusieurs substrats. L'impact de la perte d'une GST spécifique est estimé par comparaison entre l'activité de conjugaison des GST totales extraites soit du génotype sauvage soit de chaque mutant *AbΔgst*.

- **Activité non spécifique des GST totales**

Le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene ou CDNB est un composé synthétique qui sert de substrat de référence pour mesurer l'activité de GST. La conjugaison du glutathion au CDNB est mesurée pour des extraits de protéines totales issus des différents génotypes d'*A. brassicicola*. En plus du génotype sauvage, les activités de conjugaison du glutathion au CDNB des six mutants *AbΔgst* ont été évaluées (**figure 77a**). Les mutants peuvent être classés en deux catégories : Les mutants *AbΔgst2*, *AbΔgst4*, et *AbΔgst6* qui ne présentent pas une activité significativement différente du génotype sauvage ; et à l'inverse les mutants *AbΔgst1*, *AbΔgst3*, et *AbΔgst5* dont l'activité de conjugaison du glutathion au CDNB des GST totales est diminuée de plus de 50% par rapport au génotype sauvage.

- **Activité spécifique des GST totales de conjugaison du glutathion aux ITC**

L'activité GST globale a été mesurée, en utilisant les AI-ITC comme unique substrat, sur les extraits de protéines totales issus des mutants *AbΔgst1* à 6 et comparée à celle détectée pour le génotype sauvage (**figure 77b**). Les activités de conjugaison des mutants *AbΔgst1* et *AbΔgst3* sont réduites toutes les deux d'environ 80% par rapport au génotype sauvage. Les mutants *AbΔgst4* et *AbΔgst5* quant à eux présentent une réduction d'activité de 60 % approximativement. Par contre la perte des *AbGST2* et *AbGST6* n'influe pas sur la capacité des GST totales à conjuguer le glutathion aux AI-ITC.

## 2.6. Etude de l'expression du pouvoir pathogène des mutants *AbΔgst*

La disruption spécifique de gènes codant les GST sélectionnées entraîne chez le champignon une perte significative de la tolérance aux ITC et à la brassinine. Les mutants présentent également une baisse d'activité de conjugaison du glutathion aux xénobiotiques. Ce phénotype des mutants *AbΔgst1* à 6 pourrait avoir un impact sur le pouvoir pathogène *in planta*. La virulence et l'agressivité des mutants ont donc été évaluées sur choux afin de caractériser d'une part l'importance des ITC ou de la brassinine comme molécules de défense des *Brassicacées* et d'autre part le rôle respectif de chacune des 6 GST d'*A. brassicicola* sélectionnées dans les mécanismes de détoxification des composés de défenses chimiques de sa plante hôte (**figure 78**). Six jours après le dépôt de 5 µl d'une suspension à 10<sup>5</sup> conidies par ml, d'importants symptômes sont observés quel que soit le génotype inoculé. A cette pression parasitaire les mutants *AbΔgst1* à 6 sont toujours virulents. L'analyse des

symptômes produits lorsque la pression parasitaire appliquée est moins importante ( $10^4$  ou  $10^3$  conidies par ml) révèle des différences d'agressivité entre les génotypes. Les mutants *AbΔgst2* et *AbΔgst6* ont un pouvoir pathogène identique à *Ab43wt*. Le mutant *AbΔgst5* est légèrement affecté dans son agressivité. Cette différence ne s'observe qu'à la plus faible concentration inoculée où les symptômes produits par le mutant sont deux fois moins étendus que pour le témoin. Pour les mutants *AbΔgst3* et *AbΔgst4* l'agressivité diminue progressivement, représentant 60 à 70 % de celle observée chez génotype sauvage pour une inoculation de départ à  $10^4$  conidies par ml et seulement 10 à 30 % pour une inoculation de départ à  $10^3$  conidies par ml. La perte d'agressivité du mutant *AbΔgst1* est très importante même lorsque le champignon est inoculé à  $10^4$  conidies par ml ; elle ne représente alors plus que 35 % maximum de l'agressivité d'*Ab43wt*.

### 3. Synthèse et discussion des résultats

(Le **tableau 6** rassemble les principaux résultats.)

La coévolution entre les plantes et leurs pathogènes a conduit à la sélection de mécanismes de défenses élaborés qui se traduisent notamment par la production ou l'accumulation par l'hôte de métabolites secondaires au fort pouvoir antimicrobien. Les plantes de la famille des *Brassicacées* comptent parmi leurs défenses chimiques des molécules issues du métabolisme des acides aminés comme notamment les dérivés des glucosinolates, et les phytoalexines indoliques telles que la camalexine ou la brassinine (Kliebenstein, 2004). Pour réaliser leur cycle de vie, les champignons phytopathogènes inféodés à cette famille de végétaux ont développé au cours de leur évolution des stratégies de protection contre la charge fongitoxique des phytoalexines (Joubert *et al.*, 2011a et b) mais aussi probablement des phytoanticipines. *A. brassicicola* est notamment capable de tolérer, lors de sa phase infectieuse, la toxicité des isothiocyanates issus de la dégradation des glucosinolates par les myrosinases. Plusieurs hypothèses ont déjà été avancées pour expliquer cette tolérance. La plus communément acceptée propose l'existence de mécanismes de détoxification des ITC. Notamment les études de Francis *et al.* (2005) chez les insectes ou de Rahmanpour *et al.* (2009) chez *Sclerotinia sclerotiorum* placent les GST au centre de ces mécanismes impliqués dans la résistance aux ITC. Chez *A. brassicicola* l'étude du rôle des GST dans la résistance aux ITC a été initiée par Sellam *et al.* en 2006. Dans cette étude une GST surexprimée en présence d'AI-ITC est caractérisée : AbGST1. L'étude de l'activité de conjugaison du glutathion de la protéine recombinante correspondante a révélé que l'enzyme peut utiliser les AI-ITC comme substrat spécifique. Des données non publiées montrent que l'expression hétérologue d'AbGST1 dans *E. coli* confère à la bactérie une résistance significative aux ITC par rapport à la souche sauvage (Sellam, thèse de doctorat 2007).

L'étude du transcriptome d'*A. brassicicola* a permis d'isoler cinq autres gènes codant des GST putatives surexprimées en réponse aux AI-ITC et *in planta*, respectivement nommés *Abgst2* à *6*. L'analyse *in silico* des séquences protéiques, a montré qu'elles se répartissent dans différentes grandes familles des GST. Six simples mutants disruptés respectivement dans les six gènes codant les GST sélectionnées ont été générés. L'analyse i) des phénotypes des six mutants *AbΔgst1* à *6* en réponse aux composés de défenses des Brassicacées notamment aux ITC, ii) de la capacité de leur pool de GST totales à conjuguer le glutathion à divers substrats et, iii) de leur pouvoir pathogène, a permis de les regrouper en deux catégories principales.

La première de ces deux catégories regroupe AbGST2 et AbGST6. Leur implication dans le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* ne semble pas essentielle. La perte de chacune de ces deux protéines n'entraîne ni de modification d'agressivité *in planta*, ni d'altération de la capacité à



conjuguer au glutathion les AI-ITC ou le CDNB. Les mutants *AbΔgst2* ont une sensibilité aux AI-ITC équivalente au génotype sauvage. L'analyse phylogénétique place AbGST2 dans le *Cluster 1* défini par McGoldrick *et al.* (2005) qui regroupe des GST impliquées notamment dans la détoxification de molécules toxiques (Veal *et al.*, 2002 ; Mariani *et al.*, 2008). Même si AbGST2 reste relativement éloignée phylogénétiquement d'AbGST1 (23% d'identité), elle est la GST étudiée la plus proche de cette dernière qui semble jouer un rôle important dans le pouvoir pathogène. AbGST2 aurait ainsi pu être candidate aux mêmes fonctions qu'AbGST1. Cependant la perte de cette protéine n'affecte ni la tolérance aux AI-ITC ni l'agressivité d'*A. brassicicola*. Le gène codant *Abgst2* est pourtant surexprimé en présence de Bz-ITC ou *in planta*. Il apparaît donc clairement que dans ce cas ni les profils d'expression ni l'appartenance à une même classe de GST ne permettent de prédire la fonction de la protéine.

La perte d'AbGST6 n'induit pas non plus chez les mutants une perte d'agressivité *in planta* et une fonction catalytique de conjugaison du CDNB ou des AI-ITC au glutathion semble exclue pour cette protéine. Ces résultats semblent indiquer que, comme AbGST2, AbGST6 n'est pas essentielle au pouvoir pathogène d'*A. brassicicola*. Cependant la sensibilité des mutants *AbΔgst6* aux AI-ITC par rapport au génotype sauvage montre que la protéine est en lien avec les mécanismes de tolérance aux produits de dégradation des glucosinolates. L'analyse *in silico* place cette protéine dans la nouvelle classe de GST décrite par Morel *et al.* (2009) : les GTE. Cette famille méconnue n'a pas encore de fonction précise caractérisée. Leurs membres types comme les protéines bactériennes « Lig » n'ont qu'une très faible activité de conjugaison du glutathion au CDNB comme c'est le cas pour AbGST6. Cette famille semble être très conservée chez les champignons filamenteux notamment les saprophytes. Les auteurs suggèrent alors que ces protéines auraient un rôle dans la dégradation de la matière organique. Lorsque les symptômes provoqués par *A. brassicicola* sont très étendus, le champignon se développe sur les nécroses en quasi-saprophyte. AbGST6 pourrait intervenir au cours de cette phase et participer à l'acquisition de nutriment. Cette hypothèse n'explique toutefois pas la sensibilité accrue des mutants *AbΔgst6* aux AI-ITC. Un rôle dans la régénération du glutathion est également suggéré dans cette publication pour les GST de la famille GTE. La sensibilité observée en présence d'AI-ITC pourrait éventuellement s'expliquer par une absence à cours terme de substrat disponible pour d'autres GST comme AbGST1 ou AbGST3 par exemple. Il est important également de noter que les prédictions bioinformatiques localisent cette GST dans la mitochondrie alors que les autres sont localisées dans le cytoplasme (hormis AbGST4 qui semble être sécrétée). Le modèle hypothétique d'action des ITC chez *A. brassicicola* construit par Sellam *et al.* (2007) suggère que les dérivés génèrent un stress oxydatif dans la cellule fongique via la

mitochondrie. La sensibilité des mutants *AbΔgst6* aux AI-ITC serait alors corrélée avec un rôle d'AbGST6 de protection contre les ITC au niveau mitochondrial.

La seconde catégorie proposée regroupe AbGST1, AbGST3, AbGST4 et AbGST5. Les mutants disruptés dans les gènes codant ces protéines présentent une forte baisse de leur agressivité *in planta* ainsi qu'une sensibilité accrue aux AI-ITC. L'absence d'effet sur la virulence de mutants de gènes codant des GST lors de test standard de pathogénicité ( $10^5$  conidies/ml) mais une perte d'agressivité à des pressions parasitaires plus faibles avait déjà été observée dans le pathosystème *B. cinerea* / *Solanum lycopersicum* (Schulze Gronover *et al.*, 2005). Cela suppose un certain niveau de redondance fonctionnelle de ces quatre enzymes qui bien que classées dans des catégories phylogénétiques différentes jouent toutes un rôle important dans le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola*. Les observations précédentes ont permis d'émettre l'hypothèse que l'appartenance à une même famille de GST n'implique pas une redondance fonctionnelle. Il semble à l'inverse qu'une répartition de GST dans des familles différentes n'exclut pas une similarité de fonction.

AbGST1 et AbGST5 appartiennent respectivement au *cluster 1 et 2* des GST fongiques décrites par McGoldrick *et al.* (2005). Ces deux familles rassemblent des GST connues chez divers organismes pour être impliquées dans la détoxification de molécules toxiques comme GST3 caractérisée chez *S. pombe* (Veal *et al.*, 2002), GTT1 chez *S. cerevisiae* (Mariani *et al.*, 2008), ou GSTA caractérisée chez *A. nidulans* (Fraser *et al.*, 2002). Ces deux enzymes d'*A. brassicicola* semblent avoir la même fonction avec toutefois une plus grande importance d'AbGST1 dans le pouvoir pathogène.

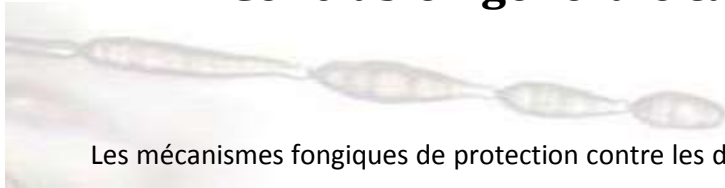
Bien qu'appartenant à une famille différente de GST, les mutants délétés dans le gène codant AbGST3 présentent un profil similaire à *AbΔgst1* ou *AbΔgst5*. Bien que peu caractérisées, les GST de la famille Omega semblent également jouer un rôle dans les mécanismes de détoxification des xénobiotiques (Morel *et al.*, 2009). Le gène codant AbGST5 est très induit par la présence d'AI-ITC, sa disruption provoque une hypersensibilité des mutants à cette molécule. Le gène est peu induit *in planta* par rapport à *Abgst3*. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse qu'AbGST5 a une affinité particulière envers les ITC mais est moins sollicité durant les phases infectieuses. AbGST1 ou AbGST3 sont très sollicités lors de l'interaction peut-être parce qu'elles possèdent une gamme de substrat plus large incluant probablement la brassinine. Des dosages d'activité de conjugaison du glutathion à plusieurs substrats par les GST totales extraites des mutants et du génotype sauvage à partir de cultures induites par les ITC ou exprimées *in planta* permettrait de hiérarchiser l'importance de chacune GST en fonction de la condition testée.

La dernière des six GST dans cette étude est AbGST4 ; les mutants délétés dans le gène codant cette enzyme de la famille des MAPEG présentent une sensibilité accrue aux AI-ITC et une baisse de l'agressivité *in planta* la plaçant dans la même catégorie d'AbGST1, 3 ou 5. Cependant son activité de conjugaison du glutathion au CDNB semble faible en condition non induite. Les GST de la famille MAPEG sont susceptibles d'être sécrétées dans le milieu extérieur (Bresell *et al.*, 2005) et ainsi pourraient protéger le champignon des FAO présentes dans la zone d'interaction hôte/pathogène grâce à leur activité potentielle de glutathione peroxydase. Les prédictions de localisation réalisées sont en accord avec une possible sécrétion d'AbGST4. La confirmation d'une telle localisation par recherche de cette GST dans des filtrats de culture devra être réalisée.

La perte de tolérance des mutants Ab $\Delta$ gst à d'autres molécules de défense des Brassicacées comme la brassinine montre que les GST peuvent avoir une faible spécificité de substrats et pourraient conjuguer le glutathion à une large gamme de xénobiotiques. Des essais de mesure d'activité de conjugaison du glutathion à la brassinine notamment par le pool de GST totales du génotype sauvage et des différents mutants est envisagée pour répondre à cette interrogation. Pour cela, les protéines totales des mutants Ab $\Delta$ gst cultivés en condition standard ou en condition inductrice (culture supplémenté en brassinine à des doses sub-létale) seront extraites. L'activité de conjugaison du glutathion à la brassinine peut alors être mesurée pour chaque extrait en quantifiant les dérivés conjugués de la brassinine après séparation par HPLC.

Certaines GST sont associées à la réponse adaptative contre les stress oxydatifs comme notamment celles appartenant au *cluster 1 ou 2* (McGoldrick *et al.*, 2005). Le rôle de ces GST dans la protection contre la toxicité des ITC pourraient intervenir plus en aval et limitant les dommages des FAO générés par les produits de dégradation des glucosinolates par exemple. Un suivi de croissance des mutants Ab $\Delta$ gst en présence de molécules générant un stress oxydatif comme l' $H_2O_2$  permettrait d'identifier les GST potentiellement candidate à cette fonction. Plus généralement, l'expression hétérologue de chacune des GST d'intérêt dans un organisme modèle comme *S. cerevisiae* devrait permettre de compléter plus spécifiquement pour chaque GST l'étude de leur capacité à conjuguer le glutathion à différents substrats.

## Conclusion générale & perspectives



Les mécanismes fongiques de protection contre les défenses chimiques des plantes hôtes sont des facteurs de pathogénie qui font appel à de multiples composantes. L'étude des déterminismes moléculaires qui régissent la tolérance d'*A. brassicicola* aux composés de dégradation des glucosinolates montre que le métabolisme du mannitol d'une part et certaines GST, d'autre part jouent un rôle complémentaire et significatif. La production et l'accumulation de mannitol dans les cellules fongiques via la voie MPD-dépendante semblent contribuer à l'adaptation à la toxicité des ITC en quenchant les FAO intracellulaires que ces composés génèrent. Certaines GST réduisent la charge fongitoxique des ITC en les conjuguant au glutathion, le complexe formé pouvant potentiellement être séquestré dans la vacuole ou excrété de la cellule. Toutefois, prises isolément, ces deux stratégies ne sont pas essentielles à la virulence mais participent à l'agressivité du pathogène.

L'étude du métabolisme du mannitol ou des GST a montré qu'ils ne sont pas restreints à un rôle de protection contre les ITC. Ils ont d'autres fonctions, parfois essentielles au cycle de vie du champignon. Le mannitol apparaît comme un sucre de stockage qui semble être remobilisé lors des étapes précoces de la croissance ou l'adaptation à des stress biotiques (tolérance au burst oxydatif *in planta*...) et abiotique (adaptation aux stress matriciels...). Son métabolisme, notamment la voie MDH-dépendante, est nécessaire à la sporulation *in planta*. La spécificité des GST ne semble pas limitée aux AI-ITC et leurs substrats potentiels pourraient comprendre aussi d'autres métabolites de défense comme la brassinine. Les GST font partie d'une famille de protéines multifonctionnelles et certaines pourraient également intervenir dans la répression du stress oxydatif par leur propriété antioxydante.

Pour mieux évaluer l'importance des ITC dans le pathosystème *Brassicacées / A. brassicicola*, la construction de mutants fongiques déficients pour les composantes majeures qui régissent la tolérance à ces composés est une stratégie possible. L'étude de la virulence de doubles mutants dans les gènes codant une protéine clef du métabolisme du mannitol et une GST impliquée dans la détoxification des ITC serait à ce titre, informative. Les gènes cibles pourraient par exemple être *Abmpd1* et *Abgst1* car chacun des simples mutants présentent une forte sensibilité aux ITC et une baisse significative d'agressivité par rapport au génotype sauvage. Une autre stratégie consisterait à

évaluer l'agressivité des souches mutantes obtenues au cours de cette thèse sur des géotypes ne produisant pas ou très peu d'ITC.

La mise en place de ces mécanismes de protection contre les ITC nécessite la perception et la transduction intracellulaire d'un signal de stress. La nature des voies de signalisation impliquées chez *A. brassicicola* dans la réponse au stress oxydatif sont encore mal connues. Chez *S. cerevisiae* la perception du stress oxydatif généré par l' $H_2O_2$  est assurée par la protéine *OPR1* qui active le facteur de transcription YAP1 à l'origine de la réponse adaptative (Delaunay *et al.*, 2002). L'étude des homologues chez *A. brassicicola* de ces protéines permettrait de vérifier leur lien potentiel avec la tolérance aux ITC. Des mutants *AbΔap1* délétés dans le gène codant l'homologue de YAP1 chez *A. brassicicola* ont été créés au cours de cette thèse. Les impacts de la mutation sur la sensibilité aux ITC ou sur le pouvoir pathogène pourront alors être testés. La possibilité que les gènes impliqués dans la réponse adaptative aux AI-ITC soient sous régulation de la voie HOG, a également été évoquée. L'étude de l'expression de ces gènes chez les mutants qui n'exprime plus la protéine *AbHog1* en condition induite par les ITC pourrait notamment aider à la caractérisation des voies de transduction du signal qui régissent la tolérance d'*A. brassicicola* aux dérivés des glucosinolates ou au stress oxydatif plus largement.

Comme stipulé par Dulermo *et al.* en 2010, le métabolisme des sucres et notamment du mannitol serait au cœur des relations trophiques entre un hôte et son parasite. Les champignons seraient capables de piéger les hexoses végétaux en les convertissant en mannitol. Nos observations semblent étayer cette hypothèse. Le suivi du devenir d'hexoses végétaux radiomarqués dans les cellules fongiques lors de l'interaction pourrait être une perspective intéressante à explorer dans le pathosystème *Brassicacées / A. brassicicola*.

Le métabolisme du mannitol apparaît comme essentiel lors de la conidiogénèse *in planta*. Cette composante du pouvoir pathogène conditionne la dissémination horizontale du pathogène. *A. brassicicola* peut également se disséminer par voie verticale via la transmission par les semences. Les mécanismes qui régissent la transmission et le maintien sur la semence font l'objet d'études novatrices. Les rôles essentiels du métabolisme du mannitol dans la tolérance aux stress matriciels laissent supposer son implication dans cette composante du pouvoir pathogène. Les conditions d'étude de la transmission des pathogènes à la semence dans un pathosystème modèle *A. brassicicola / A. thaliana* sont disponibles au laboratoire (S. Pochon, thèse de doctorat en cours de réalisation). Le champignon est inoculé sur les siliques qui sont récoltées après leur maturation. Le taux de contamination des semences qu'elles contiennent est ensuite évalué. L'analyse du taux de transmission des mutants du métabolisme du mannitol selon cette méthodologie contribuerait à la

caractérisation des mécanismes qui régissent cette étape du cycle de vie d'*A. brassicicola* encore méconnue.

Dans le cadre de l'amélioration de la protection des plantes à intérêt agronomique contre l'alternariose, le métabolisme du mannitol peut être une cible à privilégier. L'inhibition chez le champignon responsable du *black spot* des Brassicacées, de la voie MDH-dépendante aurait, pour effet de limiter la propagation horizontale de la maladie en réduisant drastiquement la production de conidie *in planta*. En relation avec les travaux de Dulermo *et al.* (2010), l'inhibition de la voie MPD-dépendante pourrait entraver le détournement des hexoses végétaux désavantageant le champignon dans la compétition pour les ressources carbonées lors de l'interaction. La perturbation de cette voie laisse également le parasite amoindri face aux mécanismes naturels de protection de la plante. Des essais *in vitro* ont montré les propriétés inhibitrices des mannitol-déshydrogénases de deux molécules : la p-Chloromercuribenzoate et la 8-hydroxy-quinoline (HQ) (Horikoshi *et al.*, 1964). La première étant un dérivé de mercure ne semble pas adaptée à l'utilisation agronomique. En revanche, la seconde est une molécule d'origine naturelle à l'activité antifongique connue (Musiol *et al.*, 2010) qui ne semble pas avoir d'effet phytotoxique (Inderjit *et al.*, 2010). Cette molécule semble un candidat potentiel comme nouvel outil de lutte contre l'alternariose. Ce type de traitement serait une alternative aux pesticides. Ne tuant pas les microorganismes, cette stratégie aurait un impact limitant ciblé sur l'agent phytopathogène confronté aux défenses de la plante hôte et respecterait la biodiversité.

## Matériel et méthodes



## Matériel et méthodes



### 1. Matériels biologiques et conditions de culture

- Matériels fongiques et conditions de culture

L'isolat Abra43 appartenant à l'espèce *A. brassicicola* a été utilisé dans ces travaux. Il provient d'isolements effectués par le GEVES (Groupe d'Étude et de Contrôle des Variétés et des Semences) à partir de semences de radis, et a été identifié sur la base de critères morphologiques et moléculaires (Iacomi-Vasilescu, 2001). Ab43wt a été retenu comme souche de référence pour cette étude car elle est très agressive sur chou et que sa capacité à sporuler *in vitro* est importante. Cette souche est maintenue par repiquages successifs du mycélium sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA : extrait de pomme de terre 0,4% (p/v), dextrose 2% (p/v), agar 2% (p/v)) ou Malt-Agar (2% (p/v) ; 2% (p/v)) à 24°C et à l'obscurité pour la croissance, et à 4°C pour la conservation. Les champignons peuvent également être cultivés en milieu liquide (Malt 2% (p/v) ou PDB 3,2%) à partir d'une suspension calibrée et sous agitation (150 rpm) à 24°C.

- Matériel végétal et conditions de culture

Les espèces utilisées sont principalement des espèces hôtes du pathogène *A. brassicicola*, c'est à dire les plantes de la famille des *Brassicacées*. Afin de préparer les extraits végétaux additionnés aux cultures liquides d'*A. brassicicola*, des graines de radis (*Raphanus sativus* variété Nationale) et de tomate (*Solanum lycopersicum* l. variété nationale) ont été semées en serre et les feuilles ont été prélevées au stade 4 feuilles vraies.

Pour les tests de pouvoir pathogène, deux espèces de plantes ont été utilisées: *Brassica oleracea* (variété Bartolo) et *Arabidopsis thaliana* (écotypes *Colombia* et *Landsberg*). Elles ont été cultivées dans des enceintes climatiques, sur terreau additionné de vermiculite avec une photopériode de 8 heures. La température est de 24°C le jour et 19°C la nuit, et l'hygrométrie est de 60% le jour et 55% la nuit dans les conditions de cultures. Pour les conditions d'inoculation, la température est de 24°C jour et nuit avec une hygrométrie saturante (100%). Les plantes sont maintenues à l'obscurité pendant 48h après inoculation pour favoriser l'interaction hôte-pathogène.



## 2. Extraction et dosage des sucres solubles

- Préparation des extraits de feuille pour cultures liquides

Les extraits végétaux sont préparés selon un protocole décrit par Jennings *et al.* (2006) à partir de 8g de tissus de feuilles. Ils sont broyés dans 100ml d'eau distillée à trois reprises pendant 30s respectivement à l'aide d'un mixeur (Waring blender). Les broyats ainsi obtenus sont filtrés sur papier filtre puis centrifugés pendant 20 à 30 min à 10000g à 4°C. Le surnageant est de nouveau centrifugé jusqu'à ce qu'il ne reste plus de culot visible. Les extraits sont finalement stérilisés sur membrane filtrante (0,22 µm, Ultrafree-MC Millipore) et stockés à -80°C. La teneur en extrait de feuille est de l'ordre de 10% (v/v) pour les cultures liquides.

- Extraction des sucres solubles

Une suspension de conidies est mise en culture liquide (Malt 2% (p/v)) à une concentration finale de  $10^5$  conidies / ml puis incubée à 24°C sous agitation (150 rpm). A l'issue de la culture, le mycélium est séparé de son filtrat de culture par filtration, les deux fractions sont stockées à -80°C pour lyophilisation.

Le lyophilisat est broyé mécaniquement, la poudre obtenue est solubilisée dans 2 ml d'éthanol à 80% puis transférée dans un tube. Le mortier est rincé avec une solution d'éthanol à 80% et la solution de lavage est rajoutée au tube. Les tubes sont alors incubés dans une étuve à 80°C pendant 5 min, puis centrifugés à 4°C pendant 5 min à 5000 rpm. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et le culot est extrait de nouveau à 2 reprises en suivant le même protocole. Les surnageant obtenus sont alors incubés à -80°C pendant toute une nuit. L'extrait est ensuite décongelé et évaporé à 50°C sous vide. Après cette étape, les résidus sont chauffés à 70°C dans une étuve pendant 1h puis dissous dans le solvant de dosage stocké à -80°C jusqu'à l'analyse.

- Dosage des sucres solubles par méthode HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) permet de séparer chaque constituant d'un mélange selon son temps d'élution. La colonne qui permet la séparation est une Aminex HPX-87C 300x7,8 mm (Guard cartridge 125-0128). Elle est utilisée à 85°C avec un flux de pompe de 600 µl/min. Le solvant d'élution est de l'eau milliQ stérile. Les standards qui ont permis de constituer une gamme étalon des sucres à doser ont une concentration de 5-10-100 et 200 mM pour le raffinose, mannitol, sorbitol, glucose, saccharose et fructose, sauf le stachyose qui a une concentration de 1-2-5 et 10 mM. Les sucres sont détectés à l'aide d'un réfractomètre par mesure de la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Les données sont collectées

par l'intermédiaire d'une station d'acquisition et le logiciel TotalChrom Navigator qui traduit les aires des pics en concentration. Chaque échantillon est au préalable filtré sur filtre stérile de 2µm et deux fois 20µl du filtrat sont injectés dans la colonne.

- Analyse des sucres solubles par RMN

Les extraits éthanoliques de sucres solubles sont suspendus dans 1ml de D<sub>2</sub>O. 500 µl sont transférés dans des tubes de 5 mm pour RMN. Ils sont analysés avec un spectromètre BRUKER Advance DRX 500 MHz équipé avec un multinuclear QNP probe (Bruker, Wissembourg, France). Un spectre RMN C<sup>13</sup> Proton-decoupled (sweep width= 31 446.541 Hz) est enregistré avec une méthodologie standard. Ces analyses ont été réalisées par Benjamin Siegler grâce à la collaboration avec le département de chimie de l'université d'Angers.

- Test du pouvoir antioxydant par mesure de l'activité antiradicalaire, piégeage du DPPH

L'activité de réduction du DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), un radical libre stable coloré, a été mesurée spectrophotométriquement (décoloration liée à la réduction) comme décrit par Dugé de Bernonville (2009) avec quelques modifications. Une gamme de dilution des extraits éthanoliques a été ajoutée à 240 µL d'éthanol dans les puits d'une microplaque (Nunc-Immuno Modules, Nunc, Roskilde, Denmark). La réaction débute avec l'addition de 30 µL d'une solution éthanolique de DPPH (3,2 mM) et la DO est mesurée à 515 nm toutes les minutes pendant 120 min par un spectrophotomètre à microplaque (µQuant, Bio-Tek, Colmar, France). Une courbe de dilution de Trolox (acide (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylique) est incluse en tant que contrôle interne dans chaque analyse. L'activité antioxydante est obtenue après calcul de la concentration en composé ou en extrait brut permettant de réduire 50 % du DPPH initial à la fin de la réaction (EC50). Cette activité est ensuite convertie en équivalents Trolox, qui correspondent au ratio entre l'EC50 du Trolox et l'EC50 du composé ou de l'extrait testé. Les mesures d'activités des extraits ont été répétées trois fois avec des réplicats internes (n=3).

### 3. Méthodes d'analyse des acides nucléiques

- Extraction d'ADN génomique

- *Méthode de Möller et al. (1992)*

300 mg de mycélium sont prélevés en raclant la surface de boîtes de Pétri puis lyophilisés. Le lyophilisat est broyé mécaniquement afin d'obtenir une fine poudre. Le broyat obtenu est transféré dans un tube 1.5 ml et remis en suspension dans 1 ml de méthanol-0,1%- $\beta$ -mercaptoéthanol. Après agitation, le mélange est centrifugé pendant 5 min et le surnageant est éliminé. Cette étape est répétée 2 fois. Le culot est ensuite séché à température ambiante pendant au moins 1 heure, puis remis en suspension dans 500  $\mu$ l de TES (Tris 100 mM pH8; EDTA 10 mM; SDS 2%) en présence de 100  $\mu$ g de protéinase K. Le mélange est incubé à 60°C pendant 1 heure avant l'addition de 140  $\mu$ l de NaCl 5 M (concentration finale de 1,4 M) et de 65  $\mu$ l de CTAB 10% (concentration finale de 1%). Après incubation à 65°C pendant 10 min, un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) est ajouté. Le mélange est conservé dans la glace pendant 30 min puis centrifugé 10 min à 4°C à 12000 g. La phase aqueuse est mélangée à 0,215 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 min puis centrifugé pendant 10 min à 4°C à 12000 g. L'ADN est précipité par addition sur le surnageant de 0,55 volume d'isopropanol froid. Le tube est agité doucement jusqu'à apparition de filaments d'ADN. Ceux-ci sont prélevés à l'aide d'une pipette pasteur et lavés dans 500  $\mu$ l d'éthanol 70%. L'ADN est séché à l'air libre, remis en suspension dans 50 à 100  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH8 ; EDTA 0,1 mM pH 8,0) contenant de la RNase (0,2mg/ml).

- *Méthode d'Edwards et al. (1991)*

Cette méthode rapide d'extraction de l'ADN a été utilisée pour extraire à la fois le mélange ADN fongique et ADN végétal des feuilles infectées dans le but d'analyser l'expression de gènes au cours d'une cinétique d'infection. Cinq feuilles infectées sont réduites en poudre fine dans un mortier en présence d'azote liquide. 400 $\mu$ l de tampon d'extraction (200 mM de Tris-HCl pH 7.5, 250 mM de NaCl, 25 mM d'EDTA et 0.5 % de SDS) sont ajoutés au broyat et l'ensemble est mélangé au vortex pendant 5 min. Après une centrifugation d'une minute à 13000 rpm, 300  $\mu$ l de surnageant sont transférés dans un tube 1.5 ml et l'ADN est précipité avec un volume d'isopropanol. Le culot obtenu après une centrifugation de 5 min à 13000 rpm est repris dans 100  $\mu$ l de tampon TE 1X.

- *Méthode Goodwin et Lee (1993)*

L'extraction de l'ADN génomique d'*A. brassicicola* est réalisée par une méthode de lyse cellulaire par micro-ondes.

- Extraction d'ARN totaux

Après un broyage dans l'azote liquide, 100 mg de mycélium en poudre sont placés dans un microtube à centrifuger. Du TRIzol (0,5 ml, Invitrogen) est ajouté et l'ensemble est agité vigoureusement au vortex. Après une incubation de 15 min à température ambiante, le mélange est centrifugé 10 min à 18 000 g. La phase supérieure est prélevée avec précaution, transférée dans un nouveau tube et 0,4 volumes (200 µL) de chloroforme  $\gamma$  sont ajoutés. Après une agitation vigoureuse de 30 secondes, l'échantillon est incubé 15 min à température ambiante avant d'être centrifugé 5 min à 18 000 g. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 350 µL d'éthanol 70% sont ajoutés. Après avoir mélangé l'échantillon 3 à 4 fois par retournement, celui-ci est transféré dans une colonne du kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) et centrifugé pendant 30 secondes à 11 000 g. La suite de l'extraction est réalisée selon le protocole du fournisseur. Un µl du volume final est utilisé pour doser les acides nucléiques au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Labtech international).

- Préparation des ADNc par reverse transcription (RT)

Les ARN purifiés sont reverse transcrits en ADN complémentaires (ADNc) afin d'être amplifiés par PCR ultérieurement. Avant l'étape de transcription inverse proprement dite, la solution d'ARN est chauffée à 80°C pendant 3 min afin de dénaturer les structures secondaires. Les ARN (5 µg) sont ensuite reverse transcrits pendant 1 heure à 42°C dans un volume de 30 µl comprenant 200 unités de rétrotranscriptase du virus de la leucémie murine Moloney (MMLV rétrotranscriptase, Promega), 400 nM d'amorce oligo(dT)<sub>15</sub>, 1 µM de random hexamères, en présence de Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, DTT 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM et de dNTP 500 µM. 50 unités de RNaseH (Promega) sont ajoutées et les enzymes sont finalement dénaturées par chauffage à 80°C pendant 10 min. La réaction est réalisée dans un thermocycleur (Biorad®) et le produit final est conservé à -20°C.

- Réaction d'amplification spécifique de l'ADN par PCR conventionnelle

La matrice d'ADN ou d'ADNc est amplifiée dans un volume final de 50 µL contenant 200 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides (dNTP, Promega), 400 nM de chaque amorce, 1 unité de GoTaq (Promega), 10 mM de tampon de réaction (Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100 (v/v), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>). Les conditions d'amplification sont les suivantes : une étape de dénaturation

initiale à 95°C pendant 3 min suivie de 30 à 35 cycles et d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 15 min. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 95°C de 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces de 50 secondes à température variable selon la nature des amorces, et une étape d'élongation à 72°C pendant un temps variable selon la taille attendue du produit amplifié. Certaines réactions d'amplification nécessitent une grande fidélité notamment lors de l'accumulation de cassette de mutation, dans ce cas les PCR sont réalisées avec une ADN polymérase haute fidélité (Taq Phusion Finnzyme) selon les indications du fournisseur.

- Hydrolyse de l'ADN

L'analyse par restriction de l'ADN nécessite l'utilisation de différentes endonucléases, utilisées à raison de 2 à 5 unités par µg d'ADN et selon les indications du fabricant (Promega).

- Clonage des fragments amplifiés

Le mélange réactionnel de ligation contient 50 à 100 ng d'ADN purifié, 25 ng de vecteur PGemT, 1,5 unités Weiss d'ADN ligase du bactériophage T4 dans le tampon d'activité (Tris-HCl 30 mM pH 7,8 ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; DTT 10 mM ; ATP 1 mM). La ligation s'effectue pendant une nuit à 4°C dans un volume final de 10 µL. Deux microlitres du mélange de ligation sont introduits par choc thermique dans des cellules thermocompétentes d'*Escherichia coli* JM 109. Les bactéries recombinées sont sélectionnées par étalement et incubation sur un milieu 2YT gélosé (2YT Bacto Peptone 1%, Extrait de levure 1%, NaCl 0,5% ; Agar 1,5% (p/v)) contenant de l'ampicilline à raison de 50 µg/ml et supplémenté de 40 µg de 5 bromo-4chloro-3indoyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) et 100 µg d'isopropyl-β-Dgalactopyranoside (IPTG), afin d'effectuer une sélection de type blanc/bleu. Les colonies blanches (potentiellement recombinantes) sont repiquées en milieu liquide (2YT additionné d'ampicilline à 50 µg/ml) et incubées une nuit à 37°C.

L'extraction et la purification des plasmides sont réalisées à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) suivant le protocole préconisé par le fournisseur. La méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim (1983) est également utilisée en routine.

- Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus après PCR ou hydrolyse enzymatique sont séparés selon leur taille par électrophorèse dans du tampon TAE 0,5X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). La migration s'effectue sous une tension de 100 V dans du tampon TAE 0,5X. Le gel est ensuite immergé dans un bain de bromure d'éthidium (BEt) à 0,5 µg/ml pendant 15 min et les fragments amplifiés sont visibles par exposition du gel au rayonnement UV (310 nm).

- Mesure de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative

La technique de PCR quantitative permet de quantifier les fragments d'ADN amplifiés spécifiquement. L'appareil utilisé au laboratoire est l'ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). La PCR quantitative est réalisée en plaque de 96 puits dans un volume final de 25  $\mu$ l. Le mélange réactionnel contient la matrice d'ADNc, 300 nM de chaque amorce et 12,5  $\mu$ l de SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystem). Les conditions de thermocyclage consistent en une étape de 2 min à 50°C, pendant laquelle l'uracile-N-glycosylase est activée de façon à empêcher l'amplification de produits PCR contaminants, une étape de 10 min à 95°C qui permet l'activation de l'ADN polymérase, suivie de 40 cycles d'amplification. Chaque cycle se compose d'une étape de 15 secondes à 95°C suivie d'une étape d'une minute à 60°C.

A la fin de la PCR, une courbe de fusion est obtenue pour chaque amplifcon. Il s'agit d'une montée lente de température jusqu'à 95°C, à raison de 0,1°C par seconde, au cours de laquelle la quantité de fluorescence baisse d'une manière brutale. Le rapport des dérivées de la fluorescence et de la température donne un pic correspondant au  $T_m$  du produit PCR. Cela permet notamment de discriminer un dimère d'amorces d'une amplification spécifique.

Pour quantifier le facteur d'induction d'un gène en fonction d'une condition donnée, le  $C_t$  de sortie doit être normalisé, dans un premier temps, par soustraction avec le  $C_t$  d'un gène de référence constitutif (ici, le gène de la tubuline). On obtient un  $\Delta C_t$  que l'on soustrait ensuite au  $\Delta C_t$  du gène étudié, exprimé en condition témoin, obtenant ainsi un  $\Delta\Delta C_t$ . Le facteur d'induction du gène est donné par application de la formule:  $2^{-(\text{efficacité du couple d'amorces}) \Delta\Delta C_t}$  (Winer et al., 1999).

#### 4. Mutagénèse dirigée sur le génome d'*A. brassicicola*

- Réalisation de la cassette de mutation

Les cassettes de mutation ont été produites selon deux la technique « double joint PCR » (Yu *et al.*, 2004) (**figure 79**). La technique « double joint PCR » se décompose en trois étapes successives. La première consiste à amplifier, d'une part les régions 5' et 3' bordant le gène d'intérêt à partir d'ADN génomique fongique, et d'autre part un gène de résistance au marqueur de sélection choisi (hygromycine B ou nourseothricine). La deuxième étape permet de fusionner les trois produits PCR purifiés (extrémité 5', marqueur de sélection et extrémité 3'). Le produit fusionné obtenu est amplifié lors de la troisième étape par utilisation d'amorces « nichées », situées aux extrémités du fragment. Après purification, environ 10 µg du produit final sont utilisés pour la transformation du champignon.

- Préparation des protoplastes d'après Cho *et al.* (2006)

Les conidies, issues d'une culture gélosée d'*A. brassicicola* d'environ 15 jours, sont mises en suspension dans 200 ml de milieu PDB. Les cultures sont mises à incuber pendant 16 heures à 24°C sous agitation (175 rpm). Les conidies germées sont ensuite récoltées par centrifugation (3200 g, 10 min) puis lavées à deux reprises dans une solution de NaCl 0,7 M. Un volume de 25 ml de solution enzymatique (NaCl 0,7M, Driselase (InterSpex,) 20 mg/ml, Kitalase 10 mg/ml (WAKO)) est ajouté. Après une incubation à 32°C pendant 3 heures, puis des filtrations successives sur des membranes de maille 60 µm et 30 µm, le milieu est centrifugé (3200 g, 7 min). Le culot contenant les protoplastes est lavé une fois dans du NaCl 0,7 M puis à deux reprises avec du STC (sorbitol 1,2 M, Tris 10 mM pH 7,0, CaCl<sub>2</sub> 50 mM) dans les mêmes conditions que précédemment. La solution de protoplastes est calibrée à 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> protoplastes/ml à l'aide d'une cellule de Thoma.

10 à 20 µg d'ADN composant la cassette de mutation précédemment obtenus sont ajoutés à 200 µl de la solution de protoplastes et l'ensemble est mélangé avec précaution. Après une incubation de 20 min dans la glace, du PEG (Polyéthylène glycol (MW 3350-4000) 60% (p/v), Tris pH 7,5 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM) est ajouté goutte à goutte en trois fois (200, 200 et 800 µl) avec 5 min d'incubation dans la glace entre chaque ajout. Une incubation finale de 20 min à température ambiante est effectuée après ajout d'1 ml de STC.

- Régénération des protoplastes

Un volume de 400  $\mu$ L de la suspension de protoplastes préalablement traitée est ajouté dans 15 ml de milieu de régénération maintenu en surfusion (extrait de levure 1 g/l, hydrolysate de caséine 1 g/l, eau 1 l, saccharose 342 g/l, agar 16 g/l) avant d'être coulé dans une boîte de Petri. Celles-ci sont incubées à 25°C pendant 6 à 16 heures. Le milieu est ensuite recouvert par 10 ml de milieu PDA contenant l'agent de sélection de la transformation (les antifongiques hygromycin B ou nourseothricin). La culture est de nouveau incubée à 25°C jusqu'à l'apparition de colonies fongiques en surface de la couche sélective. Chaque colonie est individuellement repiquée sur milieu PDA contenant l'agent de sélection puis monosporee au minimum 2 fois sur un nouveau milieu de sélection.

- Vérification des mutants par Southern-blot

Cinq microgramme d'ADN génomique extrait à partir du mycélium des différents génotypes d'*A. brassicicola* sont digéré avec des enzymes de restriction spécifique de la zone ciblée. Les fragments d'ADN digéré sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (v/v) puis transféré sur une membrane d'hybridation (PerkinElmer N.V./S.A) selon le protocole décrit par Sambrook *et al.* (1989). Les sondes d'ADN spécifiques de la région cible sont préparées par PCR Phusion™ avec une ADN Polymérase haute fidélité HotStart® (Finnzymes, Espoo, Finland) selon les instruction du fabricant.

## 5. Caractérisation phénotypique

- Dosage de l'activité des enzymes MPD et MDH

Le mycélium issu d'une culture liquide (PDB, 24°C, 150rpm) est récolté après 3 jours d'incubation par filtration puis lavé avec une solution de Tris (50mM pH 7,5). L'extraction de protéine totale se fait par broyage du mycélium lyophilisé dans 5ml de tampon d'extraction (Tris 50mM pH 7,5 DTT 5mM) par gramme de matière sèche. L'extrait est centrifugé à 20 000 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau microtube et placé à 4°C. La quantité de protéines totales de l'extrait est dosée au Nanodrop ND-1000 (Labtech international). L'activité de l'enzyme est évaluée par la lecture de l'absorbance à 340 nm toutes les 2 min pendant 20 min d'une solution réactionnelle spécifique à chaque enzyme. La solution réactionnelle pour mesurer l'activité de la MDH à lieu dans 1 ml. Elle est composée de 200  $\mu$ l de tampon de dosage (Tris 100 mM pH 7,5) en présence de 10  $\mu$ l d'extrait de protéines, 100  $\mu$ l de co-facteur NADPH 2mM et 100  $\mu$ l de substrat, du fructose à 8M. Pour mesurer l'activité de la MPD, le volume réactionnel est également de 1 ml, il se compose de 500 $\mu$ L de tampon de dosage (Tris 100 mM pH 7,5) en présence de 50  $\mu$ l d'extrait de



protéines. Le co-facteur employé est le NADH 2 mM (100µl) et le substrat de l'enzyme est le Fructose-6-phosphate à 250 mM (100 µl). La réduction des cofacteurs (NADPH/H<sup>+</sup> ou NADH/H<sup>+</sup>) par les extraits de protéines totales des différents génotypes est mesurée après ajout dans le volume réactionnel des substrats des enzymes *MDH* (fructose) ou *MPD* (fructose-6-phosphate) comme décrit dans la publication de Jennings *et al.* (2006)

- Dosage de l'activité de conjugaison au glutathion des enzymes GST

L'activité GSH-transférase a été évaluée sur les extraits totaux protéiques des différents génotypes d'*A. brassicicola*. 50µl d'extrait protéique est mélangé à 1ml du tampon contenant 1mM CDNB, 1mM GSH et 0.11M de phosphate de sodium pH 6.5 et l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 5 min. La formation du complexe GS-CDNB est suivie par mesure de l'absorbance à 340nm et l'activité transférase a été calculée comme étant le nombre de mole de CDNB conjugué par mg de protéine par minute.

L'activité transférase vis-à-vis des AI-ITC a été déterminée en suivant le protocole décrit par Sellam (2007). 50µl d'extrait protéique est mélangé à 1ml du tampon contenant 20µM d'AI-ITC, 1mM GSH et 40mM de phosphate de sodium pH 8.5 et l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 6 min. La formation du complexe GS-ITC est suivie par mesure de l'absorbance à 274nm et l'activité transférase a été calculée comme étant le nombre de mole de l'AIITC conjugué par mg de protéine par minute.

- Analyse de croissance fongique par turbidimétrie

La néphélométrie a été utilisée pour mesurer la croissance fongique dès les premiers stades du développement fongique: la germination de la conidie, l'élongation et la ramification des hyphes. C'est une technique de mesure du trouble qui prend en compte les particules dans la totalité du milieu de culture. Un récepteur comptabilise les rayons laser déviés et les traduit en RNU, unité arbitraire néphélométrique, proportionnelle à la concentration en particule du soluté. Une analyse cinétique de la croissance fongique sur 33h permet d'obtenir une courbe de croissance représentative du développement du champignon. Les analyses sont effectuées sur une microplaque de 96 puits (Greiner). 300 µl de PDB supplémenté selon l'étude sont inoculés avec des conidies âgées de 15 jours maximum. La culture se fait à 24°C sous agitation 175 rpm pendant 5 min puis au repos les 5 min suivantes. Les mesures sont prises toutes les 10 min, après agitation. Une matrice de traitement des résultats a été construite sous Excel pour normaliser les données brutes et les traduire en graphique. Cette technique innovante mise au point au cours de cette thèse a fait l'objet

d'une publication : Joubert, Calmes *et al.*, (2010). Cet article est disponible dans son intégralité au point 7 (page ) du matériel et méthode.

- **Utilisation de l'outil néphélométrique pour évaluer le taux de contamination fongique d'une graine**

Pour un pathogène transmissible par les semences, sa conservation sur le tégument de la graine est une condition *sine qua none* pour la réalisation de son cycle parasitaire. Lors de leur maturation les semences transitent par une phase importante de dessiccation qui peut abaisser le potentiel hydrique à sa surface jusqu'à -1,7 MPa. Les conidies présentes doivent survivre à ce stress abiotique et garder leur capacité germinatives pour pouvoir amorcer un nouveau cycle. Jusqu'alors il n'existait pas de moyen technique pour évaluer le taux de conidies vivantes présentes sur les semences. Parmi les tests existants, le plus fréquent consiste à déposer des graines potentiellement contaminées sur un milieu de culture et définir un pourcentage de graines qui développent une colonie mycélienne. Pour évaluer la fiabilité de ce test, des lots de graines de radis préalablement désinfectées ont été inoculés *in vitro* avec une gamme suspensions de conidies d'*A. brassicicola* (génotype sauvage). 30 graines sont immergées dans une suspension de 5 ml de conidies pendant 30 min. La suspension est ensuite retirée et le lot de graine est mis à sécher 1h sous hôte. Les graines sont ensuite disposées par lot de dix sur boîte de Petri (eau gélosée 2% d'agar, 2% glucose). Après 1 semaine d'incubation à 24°C à l'obscurité, l'apparition de colonies fongiques est observée (**figure 80**).

Aucun développement de colonie fongique n'est visible à partir des graines non inoculées. La désinfection au NaOCl est efficace. En revanche 100% des graines inoculées, indépendamment de la concentration en conidies, présentent un développement de colonie d'*A. brassicicola*. La seule différence notable est l'absence de germination pour 2 des 20 graines inoculées avec une suspension à  $10^5$  c/ml. Ce type de test ne nous permet donc pas d'évaluer un taux de contamination sur une graine.

Un protocole néphélométrique a été adapté afin de lire une cinétique de croissance fongique issue d'une graine inoculée (**figure 81**). Une graine par puits est déposée sur une plaque Greiner® 96 puits. 300 µl de PDB est ajouté à chaque puits. La plaque est placée dans le néphélomètre suivant un protocole standard sans agitation (25°C, 175 rpm, 90 de gain, 20% d'amplitude). Le lag-time de la courbe de croissance fongique obtenue est représentative de la population de conidies vivante présente à la surface de la graine (**tableau 7**). Les semences de radis issues des mêmes lots artificiellement inoculés ayant servis pour les tests en boîte de Pétri ont été analysées par néphélométrie.

Le log de la concentration en conidie en fonction du lag-time peut être tracé. Le lag-time est proportionnel au taux de conidies présent sur la graine avec un  $R^2$  de 0.94. Cependant il s'agit là d'un test préliminaire et l'analyse d'une gamme de contamination des graines plus large et plus précise permettra de d'augmenter ce pourcentage de corrélation. L'analyse néphélométrique permet donc d'évaluer le taux d'infection sur une graine. Les lag-times semblent représentatifs du nombre de conidies vivantes présentes à la surface des semences. Ce protocole peut être appliqué à la mesure de la conservation de conidies sur graines.

- Analyse de croissance fongique par mesure de la croissance radiale

Les solutions contenant les différents composés testés sont incorporées au milieu PDA encore en fusion et le mélange est coulé dans des boîtes de Petri. Pour chaque test, trois répétitions par génotypes et par conditions sont réalisées. A partir d'une culture fongique âgée d'une semaine, des disques mycéliens de 8 mm de diamètre sont prélevés et déposés au milieu de chaque boîte de culture supplémentée ou non. La croissance mycélienne a été évaluée au bout de 10 à 15 jours d'incubation à 24°C par mesure du diamètre de la colonie fongique.

- Génération d'un stress matriciel en boîte de Petri avec du PEG

Du milieu Vogel est préparé sans ajout de sucre et additionné de tampon MES (1,2 g/l). Le pH est ajusté à 5,7 puis la solution est complétement avec 15 g/l d'Agar. Après autoclavage, 20 ml de milieu exactement sont coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. A nouveau du milieu Vogel est préparé (sans sucre ajouté, MES à 1,2 g/l, 15 g/l d'Agar, pH 5,7) et autoclavé. Le PEG est ajouté au milieu en surfusion : 0 g pour un potentiel hydrique final de 0,25 MPa ; 400 mg pour -0,7 MPa ; 700 mg pour -1,7 MPa. Le milieu gélosé préalablement coulé et séché est recouvert de 30 ml de solution liquide PEG, les boîtes sont recouverte et le PEG est laisser à infuser dans l'agar toute une nuit. Le lendemain le surplus de solution est éliminé. Les inoculum peuvent alors y être déposer pour réaliser un test de sensibilité au stress matriciel.

- Déterminisme du pouvoir pathogène

A partir de cultures d'*A. brassicicola* âgées de 7 jours, une suspension de conidies calibrées est préparée dans de l'eau stérile. Les feuilles des plantes de *B. oleracea* ou *A. thaliana*, au stade 4 à 6 feuilles vraies sont inoculées par dépôt de 5 µl de la solution de conidies. Après l'inoculation, les plantes sont conservées à l'intérieur des enceintes climatiques dans les mêmes conditions de croissance que les plantes saines avec une humidité relative saturante. L'obscurité est maintenue pendant 48 heures après l'inoculation. Les symptômes sont appréciés par mesure du diamètre de la nécrose ou de l'halo chlorotique. La sporulation *in planta* est évaluée par comptage des conidies

présentes sur les symptômes. La zone symptomatique est découpée et placée dans un microtube avec 1ml d'H<sub>2</sub>O stérile à 0.01% de tween 20. Le tube est placé au vortex à puissance maximale pendant 30s et les résidus végétaux sont retirés. Le titre de la suspension de conidies est estimé sous microscope à la cellule de Thoma.

- Coloration au solophényl d'*A. brassicicola* *in planta*

Les structures d'*A. brassicicola* spécifiques à la pénétration des tissus hôtes appelées pseudo-appressoria ont été observée par microscope à fluorescence Leica. Les feuilles de choux inoculée sont décolorée et les structures fongiques sont colorée avec du Solophényl Flavine 7GFE 500 (Ciba Specialty Chemicals, NC) décrit dans la publication de Hoch et al. (2005).

## 6. Outils d'analyse *in silico*

- Recherche de similarités de séquences par BLAST

Des recherches de similitude de séquences sont effectuées par BLAST (Altschul and Lipman, 1990). Plusieurs bases de données correspondant à des génomes fongiques ont été utilisées : GSC (Genome Sequencing Center, <http://genome.wustl.edu/tools/blast>), Saccharomyces Genome Database (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/getSeq>) et les banques du Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/cgi/>).

- Prédiction et analyses de séquences codantes et de motifs

Les logiciels Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) et Translate Tool (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) sont utilisés pour la prédiction des séquences codantes. Une prédiction des sites majeurs de régulation situés sur la région promotrice des gènes est réalisée à l'aide du logiciel Yeastract (<http://www.yeastract.com/formtfsbindingsites.php>). La construction d'arbres phylogénétiques a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA 4 et selon la méthode de Neighbour-joining. Enfin, les profils d'hydrophilie, la structuration des protéines et l'existence de structures secondaires sont prédits respectivement par les logiciels PepStats (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>), IUPRED (<http://iupred.enzim.hu/>), PELE (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>) et ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>).

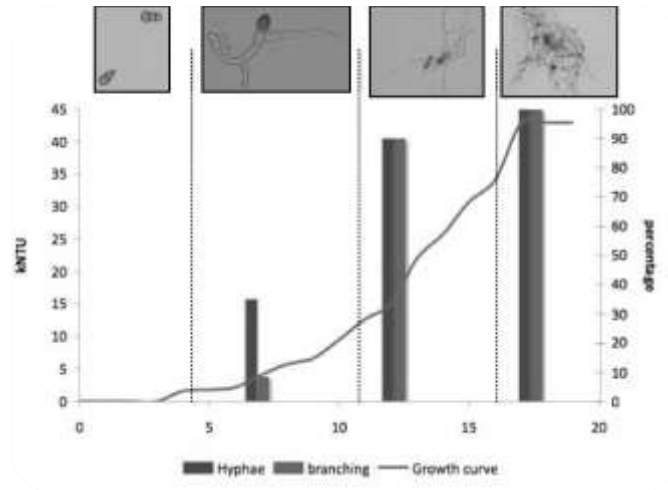
- Alignement de séquences

Les logiciels ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) et Lalign ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) ont été utilisés pour aligner les séquences nucléotidiques ou protéiques.

- Définition des amorces oligonucléotidiques pour PCR

Les amorces utilisées pour la PCR conventionnelle sont définies à l'aide des logiciels Primer3 ([http://biocore.unl.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://biocore.unl.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) et Amplify 3.0 (Université du Wisconsin). Le logiciel Primer Express (Applied Biosystems) est utilisé pour la définition des amorces utilisées en PCR quantitative.

## 7. Article : Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth



# Reports

## Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth

Aymeric Joubert<sup>1\*</sup>, Benoît Calmes<sup>1\*</sup>, Romain Berruyer<sup>2</sup>, Marc Pihet<sup>3,4</sup>, Jean-Philippe Bouchara<sup>3,4</sup>, Philippe Simoneau<sup>1</sup>, and Thomas Guillemette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IFR 149 QUASAV, UMR PaVè A77, Angers, France, <sup>2</sup>IFR 149 QUASAV, UMR GenHort 1259, Angers, France,

<sup>3</sup>Groupe d'Étude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Université d'Angers, Angers, France, and

<sup>4</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

*BioTechniques* 48:XXX-XXX (May 2010) doi: 10.2144/000113399

Keywords: nephelometry; growth curve; filamentous fungi; phenomic; *Aspergillus*; *Candida*; *Neurospora*; *Alternaria*

\*A.J. and B.C. contributed equally to this work.

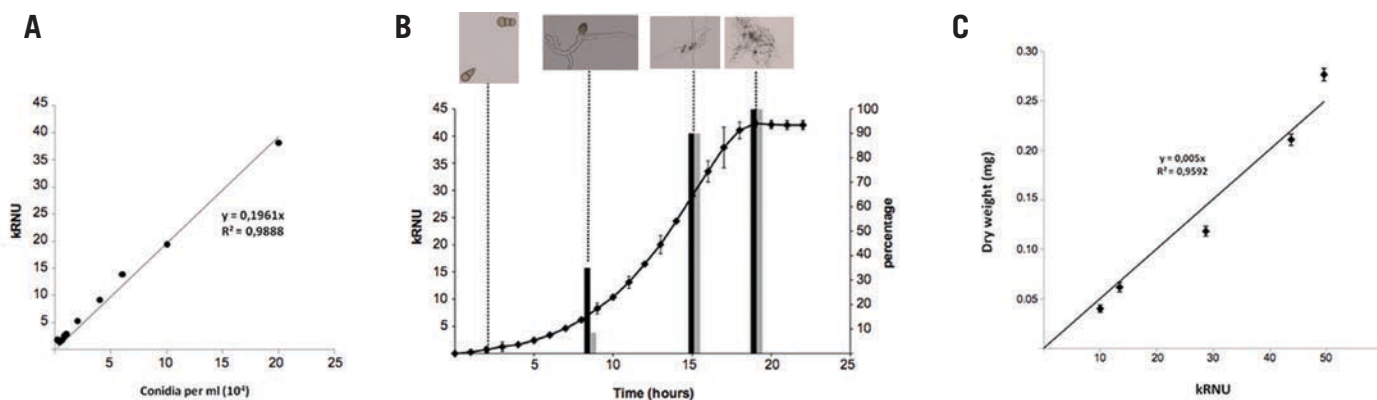
By contrast with photometry (i.e., the measurement of light transmitted through a particle suspension), nephelometry is a direct method of measuring light scattered by particles in suspension. Since the scattered light intensity is directly proportional to the suspended particle concentration, nephelometry is a promising method for recording microbial growth and especially for studying filamentous fungi, which cannot be efficiently investigated through spectrophotometric assays. We describe herein for the first time a filamentous fungi–tailored procedure based on microscale liquid cultivation and automated nephelometric recording of growth, followed by extraction of relevant variables (lag time and growth rate) from the obtained growth curves. This microplate reader technique is applicable for the evaluation of antifungal activity and for large-scale phenotypic profiling.

### Introduction

Since the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was sequenced in 1996 (1), the number of available fungal genome sequences has increased by one order of magnitude. Over 100 complete fungal genomes have been publicly released or are currently being sequenced, thus representing the widest sampling of genomes from any eukaryotic kingdom (2). This fungal genomics boom has greatly expanded our view of the genetic and physiological diversity of these organisms. However, the function of many proteins encoded by the genome has not yet been experimentally determined. Targeted inactivation of the corresponding genes and subsequent phenotypic characterization of resulting mutants are frequently the first important step toward determining the cellular role of proteins. Deletion strain collections of all genes in the genome are now available for model organisms such as *S. cerevisiae* (EUROSCARF, Frankfurt, Germany) and the filamentous ascomycete *Neurospora crassa* (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, Missouri). These initiatives have paved the way to the development of phenomics: large-scale quanti-

tative phenotypic analysis of genotypes on a genome-wide scale (3). Procedures based on microscale liquid cultivation and optical recording of growth in automated microplate systems have been developed for high-throughput quantitative phenotypic profiling of yeasts (4,5). Concerning filamentous fungi, assays based on the analysis of colony expansion rates on solid media or on microscopic measurement of the length of hyphae can generate quantitative phenotypic data. However, such screenings are cumbersome and time-consuming, and therefore not suitable for large-scale phenotypic analysis. Moreover, the specific effects of a particular mutation and/or environment on different fungal growth features (such as the lag phase, rate of growth, and growth yield) cannot be deduced from data obtained on solid media. Despite the fact that they are theoretically only applicable for unicellular organisms (6), spectrophotometric assays have also been developed to monitor the growth of filamentous fungi in microbroth systems over time (7,8) [Q1]. However, the accuracy of spectrophotometric readings may be hampered by the presence of clumps of hyphae and the nonhomogeneous growth

of filamentous fungi in liquid media. Moreover, a major drawback of spectrophotometric methods, irrespective of the kind of cells under analysis, is that extinction in cell suspensions is proportional to the cell density only at rather low values. Usually, it is considered that this lack of proportionality is significant at OD values >0.5 and that only corrected photometric readings should be used for values beyond the range of proportionality (7,9,10). By contrast with spectrophotometry, which measures the transmission of light, nephelometry (another light-based technique for measuring medium opacity) uses light scattering. This parameter is directly proportional to the cell density and is suitable for a broad range of cell densities. Since its first description for counting yeast suspensions (11), nephelometry has been routinely used to study the growth of *S. cerevisiae*, and a microbroth kinetic system was recently developed to monitor the growth of some *Candida* yeast species (12,13). As it has also been successfully used for quantifying particles in nonhomogeneous suspensions, we assumed that nephelometry might be suitable for plotting accurate growth curves for filamentous



**Figure 1. Use of laser nephelometry for fungal propagule determination and growth curve monitoring.** (A) Correlation between the number of conidia of *A. brassicicola* and RNU values. RNU values were obtained from serial dilutions of conidia. Conidia were harvested in sterile water from PDA [Q12] plates and conidial densities were determined microscopically using a Thoma's counting chamber. Conidial suspensions were then diluted to obtain the desired concentrations (600–60000 conidia/well). RNU measurements were done immediately without incubation for each calibrated suspension. (B) Nephelometric growth curve of *A. brassicicola* in PDB. The initial suspension was adjusted to 10<sup>5</sup> conidia/mL and the nephelometric values were automatically recorded for each well every hour. The microscopic morphology was examined at different time points and the percent of conidia developing hyphae (black column) or branching (gray column) was estimated in duplicate at 2, 8, 15, and 19 h. (C) Regression curves of kRNU versus dry weight for *A. brassicicola*. The mycelial mass was collected at different time points of the growth curve and dry weight values were determined for the total biomass from 12 wells. [Q13]

fungi. In this study, we took advantage of the commercial availability of a laser-based microplate nephelometer to develop a method based on microscale liquid cultivation for automated recording of fungal growth. This procedure was evaluated with phytopathogenic (*Alternaria brassicicola*) or human pathogenic (*Aspergillus fumigatus* and *A. terreus*) filamentous fungi and the yeast *Candida glabrata*.

## Materials and methods

### Fungal strains and cultivation media

The *A. brassicicola* wild-type strain *Abra43* used in this study was isolated from *Raphanus sativus* seeds. Two disruptants—*Abhog1Δ1* and *Abnik1Δ3*—were obtained from the wild-type strain *Abra43* as previously described (14). Strains of *A. terreus* and *C. glabrata* were recovered from clinical samples (15) and deposited at the Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology section (IHEM; Brussels, Belgium) culture collection. The reference strain 18963 of *A. fumigatus*, used for sequencing the genome of this species, was obtained from IHEM. *A. brassicicola* and *Aspergillus* strains were cultivated at 24°C on potato dextrose (PD) agar medium (Difco [Q2]). *C. glabrata* strains were grown at 30°C on YPD [Q3] (Sigma [Q4]) agar.

### Growth curve measurements

For inoculum preparation, conidia of filamentous fungi were collected from 8-day-old solid cultures by adding PD broth followed by gentle scraping of the agar plates. They were then counted in a Thoma's chamber and the conidial suspen-

sions were diluted to obtain the desired concentrations. Overnight precultures of *C. glabrata* isolates were harvested by centrifugation [Q5], washed in sterile water, and inoculated to OD 0.10–0.15 in fresh YPD medium. The microplate wells were filled with calibrated suspensions (300 μL/well).

Growth was automatically recorded for ≥30 h at 25°C for filamentous fungi and at 30°C for yeast using a nephelometric reader (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany), equipped with a 635-nm laser as radiation source. During incubation, the 96-well plates were subjected to shaking at 175 rpm for 5 min every 10 min. Measurements were done every hour with a gain value of 90 and a percentage of the maximum value of 20%. Each well was measured for 0.1 s with a laser beam focus of 2.5 mm.

### Analysis of growth data

Data were exported from Nephelostar Galaxy software in ASCII format and further processed in Microsoft Excel ([Q6] Microsoft, Redmond, Washington, USA) and R 2.6.1 (<http://cran.r-project.org> [Q7]). All data presented herein was obtained from two independent biological repetitions. Each repetition included three technical replicates. Both lag time and maximal growth rate variables were calculated from the growth curves using a calculation method derived from that reported for yeast cultures (5). First, an initial relative nephelometric unit (RNU) value was calculated as the mean of the initial three measurements and then subtracted from each curve value. For each point of

the curve, a slope was calculated using measurements made 2 h before and 2 h after that time point. The lag phase was defined as the time required to obtain a slope value of 1. The maximal growth rate was defined as the highest slope. Homoscedasticity and normality of residues were checked using Breusch-Pagan and Shapiro-Wilk tests, respectively.

### Dry weight measurements

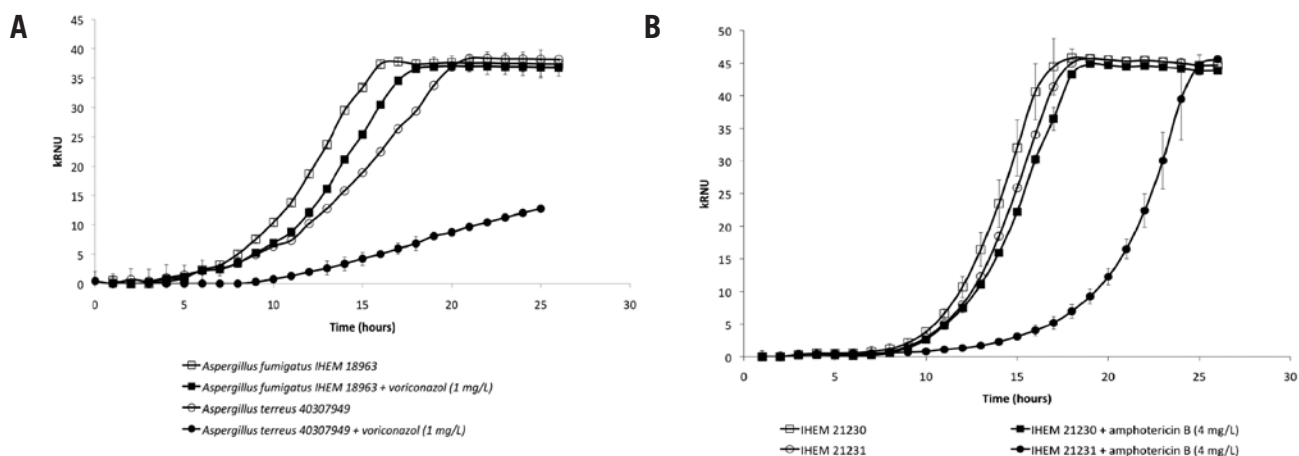
The initial conidial suspension was adjusted to 10<sup>5</sup> conidia/mL (i.e., 30000 conidia/well) in PDB [Q8]. The mycelial mass was collected at different time points of the growth curve of *A. brassicicola*. Dry weight values were determined for the total biomass from 12 wells after freeze-drying until constant weight.

## Results and discussion

### Proportionality between nephelometric values and cell densities

The nephelometric values were tested for linearity through serial dilution of conidia of *A. brassicicola*. At all tested densities (ranging 600–60,000 conidia/well), there was a linear relationship between the number of conidia and the RNU ( $R^2 = 0.988$ ) at least until saturation of the light detector [which was adjusted to 50,000 RNU [Q9] (Figure 1A)]. A direct consequence of the linear relationship between the number of fungal propagules and RNU is that the raw values do not need to be converted to corrected values before growth curve analysis. Moreover, the nephelometer can be used as an accurate tool for calibrating fungal inoculum or





**Figure 2. Nephelometric monitoring of growth for antifungal susceptibility testing.** (A) Growth curves describing the effect of voriconazole (1 mg/L) on isolates of *Aspergillus fumigatus* (IHEM 18963) and *A. terreus* (IHEM 23439). (B) Growth curves describing the effect of amphotericin B (4 mg/L) on two isolates of *C. glabrata* (wild-type IHEM 21231 and clinical isolate IHEM 21230). [Q14]

evaluating the capacity of mutants to sporulate.

### General growth characteristics of filamentous fungi in a laser-based microplate nephelometer

Figure 1B shows a representative growth curve for *A. brassicicola* plotted from the nephelometric assays. A similar growth pattern was obtained from *N. crassa* or *Aspergillus* inocula (data not shown) and was reproducible in both the biological and technical replicates. The initial suspension was adjusted to  $10^5$  conidia/mL (i.e., 30,000 conidia/well) in PDB and the nephelometric values were automatically recorded for each well every hour after shaking. In order to correlate the RNU changes with the morphology of the fungal colonies, the microplate well contents were harvested at given intervals and the hyphae and branching numbers were estimated by microscopic examination. Dry weight values were also determined for the mycelial mass at different time points of the growth curve.

Monitoring the filamentous fungi growth kinetics by nephelometry resulted in typical microbial growth curves containing a lag phase, a maximal growth rate phase [Q10], and a plateau. In our experimental procedure, this last step cannot be considered as a classical stationary phase; rather, it corresponds to the saturation value of the detector (adjusted to 50,000 RNU). This saturation step did not have an impact on shape of the growth curves or on extrapolated growth variables (lag time and maximal growth rate). A biological plateau could be reached by lowering the nutrient source (data not shown). However, the use of a poor medium might result in erroneous data (as reported

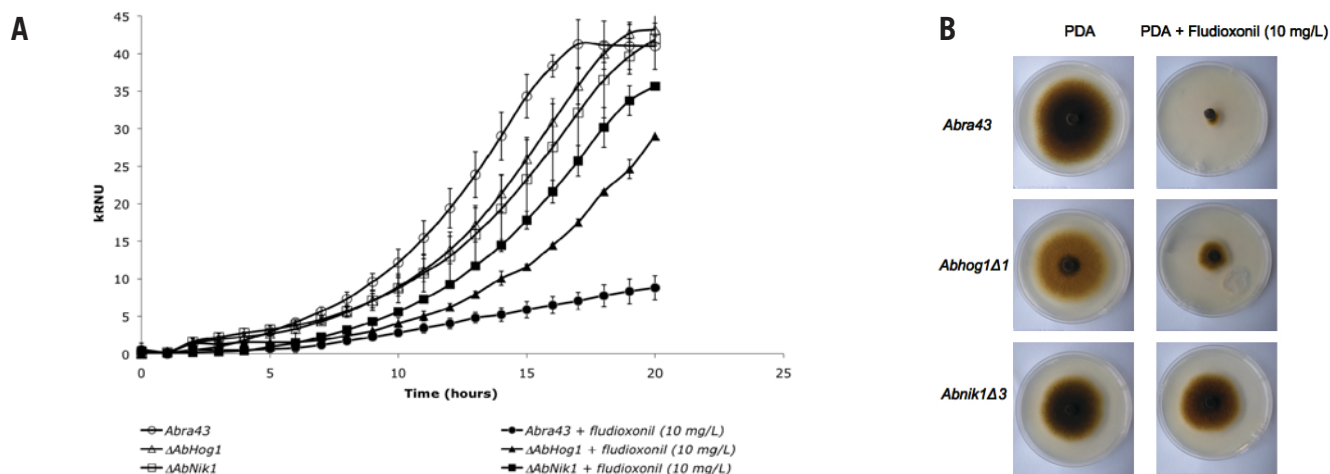
by Reference 8). Microscopic examinations revealed a correlation between the RNU variations and the extension and branching of hyphae from conidia. *A. brassicicola* conidia germination did not occur within 5 h of incubation, which was a period with low RNU variation (between 0 and 4000 RNU). After 18 h of incubation, all conidia had produced branched hyphae and a dense mycelium covered the bottom of the wells. Alongside the microscopy images, Figure 1C showed that dry weight values of mycelial biomass correlated with recorded nephelometry measures ( $R^2 = 0.959$ ), providing evidence that laser nephelometry is an accurate indicator of the fungal biomass and can be used as reliable tool for the monitoring of fungal growth.

### Growth curves in the presence of antifungal compounds

As extrapolated from the yeast absorbance growth curves (5), two standard growth variables for filamentous fungi could be defined: the maximum growth rate and the length of the lag phase (or lag time). (For calculation details, see the “Materials and Methods” section.) These values provide precise parameters that can be used for analysis of growth inhibition curves and antifungal activity of natural or synthetic substances. Figures 2 shows two examples of antifungal susceptibility testing with important human pathogenic fungi. The sensitivity of a fungus to a drug could result in different types of growth aberration. A first effect is illustrated in Figure 2A. The sensitivity of a clinical *A. terreus* isolate (IHEM 23439) to voriconazole (a triazole molecule which is recommended for the treatment of invasive aspergillosis) resulted in a significant reduction of the maximum

growth rate (from  $3.66 \text{ kRNU/h} \pm 0.06$  for the control to  $1.91 \text{ kRNU/h} \pm 0.27$  after exposure to voriconazole at 1 mg/L). By comparison, the maximum slope ( $4.39 \text{ kRNU/h} \pm 0.40$ ) of the *A. fumigatus* reference strain (IHEM 18963) was only slightly affected when challenged with this drug at the tested concentration, which was in agreement with the minimum inhibitory concentrations (MICs) of voriconazole determined for these two *Aspergillus* strains using the E test method ( $0.064 \text{ mg/L}$  for *A. terreus*, IHEM 23439 and  $0.25 \text{ mg/L}$  for *A. fumigatus*, IHEM 18963). Figure 2B shows another type of inhibitory effect caused by the application of amphotericin B (4 mg/L) on *C. glabrata* suspensions. When using the E test method on Casitone agar, the clinical isolate IHEM 21230 was shown to be less susceptible to polyenes than the wild-type isolate IHEM 21231 with a MIC of amphotericin B more than twice that reported for the wild-type isolate (15). The resistance of isolate 21230 was perfectly illustrated by nephelometric recording, since the growth curves obtained with or without amphotericin B were almost identical [Q11]. By contrast, the sensitivity of the wild-type was clearly explained by a delayed entry into the log phase, while its maximum growth rate ( $6.48 \text{ kRNU/h} \pm 0.51$ ) remained unaffected. Lag times were estimated at  $6.50 \text{ h} \pm 0.71$  and  $14.50 \text{ h} \pm 0.71$  for the control and treated conditions, respectively.

In an attempt to create a methodology for large-scale phenotypic profiling, we applied a strategy similar to that used for antifungal susceptibility testing to compare the phenotypes of deletion and wild-type strains on the basis of growth behavior during micro-cultivation. In this study,



**Figure 3. Determination of fludioxonil susceptibility in null mutants of *A. brassicicola* deficient in genes from the HOG-related pathway.** (A) Nephelometric growth curves of wild-type and two deletion strains (*Abhog1Δ1* and *Abnik1Δ3*) following exposure to fludioxonil (10 mg/L) and under standard conditions. (B) Mycelium radial growth measurements on agar media. Agar disks were cut from the margin of a 7-day-old colony growing on PDA and were transferred onto the center of a PDA medium supplemented with fludioxonil at 10 mg/L. Growth was scored after 7 days of incubation at 24°C. [Q15]

we tested two *A. brassicicola* null mutants (*ΔAbHog1* and *nik1Δ3*) and the corresponding wild-type (*Abra43*) for susceptibility to the phenylpyrrole fungicide fludioxonil (Figure 3A). It was previously reported that this compound exerts its toxicity in filamentous fungi through targeting of the high-osmolarity glycerol (HOG) pathway, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade involved in the response to high osmotic stress (14,16). The genes *AbNIK1* and *AbHOG1* encode an osmosensor group III histidine kinase and the MAP kinase of the HOG pathway, respectively. The wild-type strain was highly susceptible to the fungicide, according to the nephelometric growth records. At 10 mg/L of fludioxonil, the lag time was increased by 4× and the maximal slope was reduced by 6×, compared with control conditions. By contrast, *Abnik1Δ3* was found to be highly resistant (roughly similar lag time and maximum growth rate under both control and treated conditions), while *Abhog1Δ1* exhibited moderate resistance to this fungicide (the lag time was increased by 1.5× and the maximum growth rate was decreased by 1.3× in the presence of 10 mg/L of fludioxonil). The growth patterns obtained by nephelometric recording were confirmed by mycelium radial growth measurements on agar media (Figure 3B). We also observed distinct nephelometric profiles revealing various levels of susceptibility toward fludioxonil in different *N. crassa* mutants deficient in genes from the Hog/Os-related pathway (data not shown). These fungicide susceptibility patterns are in accordance with results obtained with deletion mutants of orthologous genes in the southern corn leaf blight fungus *Cochliobolus heterostrophus*,

thereby confirming that some filamentous fungi have two pathways that additively control phenylpyrrole fungicide sensitivity (17). Both are regulated by a group III histidine kinase but only one controls HOG1-type MAPK phosphorylation.

In conclusion, we present evidence that a laser-based microplate nephelometer can be used as a reliable tool for monitoring filamentous fungus growth. In comparison with the current standard method based on radial growth measurements on solid media, the microplate reader of this system provides many advantages, such as fast and easy handling of large numbers of samples, a reduction in the amount of test substances, and a rapid and accurate measuring mode with computerized processing of the quantitative data. Moreover, the raw values do not need to be corrected for nonlinearity before quantitative analysis, and altered growth can be easily interpreted on the basis of a change in the length of the lag phase, the rate of growth, or both, which is not the case for colony-size measurements. We believe that this system could be successfully applied for a broad range of filamentous fungi, yeasts, and bacteria for large-scale screening based on quantitative changes in growth phenotypes under a wide variety of growth conditions. Thus, the method described herein paves the way for the development of a high-resolution quantitative phenomic approach for filamentous fungi, as is already available for yeast (18).

## Acknowledgments

This work was partly supported by the Région Pays de la Loire (COSAVE research program). We thank David Manley for

correcting the English version of the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## References

- Goffeau, A. 1996. 1996: a vintage year for yeast and Yeast. *Yeast* 12:1603-1605.
- Galagan, J.E., M.R. Henn, L.J. Ma, C.A. Cuomo, and B. Birren. 2005. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Res.* 15:1620-1631.
- Warringer, J., E. Ericson, L. Fernandez, O. Nerman, and A. Blomberg. 2003. High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15724-15729.
- Maresova, L. and H. Sychrova. 2007. Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *BioTechniques* 43:667-672.
- Warringer, J. and A. Blomberg. 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20:53-67.
- Ison, A.P. and G.B. Matthew. 1997. Measurement of biomass, pp. 103-129. In D. Rickwood and B.D. Hames (Eds.), *Applied Microbial Physiology: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Broekaert, W.F., F.R.G. Terras, B.P.A. Cammue, and J. Vanderleyden. 1990. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:55-59.
- Meletiadiis, J., J.F. Meis, J.W. Mouton, and P.E. Verweij. 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J. Clin. Microbiol.* 39:478-484.
- Dalgaard, P., T. Ross, L. Kamperman, K. Neumeyer, and T.A. McMeekin. 1994. Estimation of bacterial growth rates from

- turbidimetric and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.* 23:391-404.
10. Lawrence, J.V. and S. Maier. 1977. Correction for the inherent error in optical density readings. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:482-484.
  11. Peskett, G.L. 1927. Studies on the growth of yeast: a nephelometric method of counting yeast suspensions. *Biochem. J.* 21:460-466.
  12. Fouda, M.M., D. Knittel, U.C. Hipler, P. Elsner, and E. Schollmeyer. 2006. Antimycotic influence of beta-cyclodextrin complexes--in vitro measurements using laser nephelometry in microtiter plates. *Int. J. Pharm.* 311:113-121.
  13. Seyfarth, F., S. Schliemann, P. Elsner, and U.C. Hipler. 2008. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int. J. Pharm.* 353:139-148.
  14. Dongo, A., N. Baraille-Simoneau, C. Campion, T. Guillemette, B. Hamon, B. Iacomì-Vasilescu, L. Katz, and P. Simoneau. 2009. The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide ambruticin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:127-134.
  15. Vandeputte, P., G. Tronchin, G. Larcher, E. Ernoult, T. Berges, D. Chabasse, and J.P. Bouchara. 2008. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3701-3709.
  16. Kojima, K., Y. Takano, A. Yoshimi, C. Tanaka, T. Kikuchi, and T. Okuno. 2004. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 53:1785-1796.
  17. Izumitsu, K., A. Yoshimi, and C. Tanaka. 2007. Two-component response regulators Ssk1p and Skn7p additively regulate high-osmolarity adaptation and fungicide sensitivity in *Cochliobolus heterostrophus*. *Eukaryot. Cell* 6:171-181.
  18. Fernandez-Ricaud, L., J. Warringer, E. Ericson, I. Pylvanainen, G.J. Kemp, O. Nerman, and A. Blomberg. 2005. PROPH-ECY--a database for high-resolution phenomics. *Nucleic Acids Res.* 33:D369-D373.

Received 26 November 2009; accepted 8 March 2010.

Address correspondence to Thomas Guillemette, IFR 149 QUASAV, UMR PaVé A77, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers Cedex, France. email: Thomas.guillemette@univ-angers.fr

# Bibliographie

## -A-

Aires A, Mota VR, Saavedra MJ, Rosa EA, Bennett RN : **The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract.** J Appl Microbiol. 2009 Jun;106(6):2086-95. Epub 2009 Mar 9.

Aguilar-Osorio G, Vankuyk PA, Seiboth B, Blom D, Solomon PS, Vinck A, Kindt F, Wösten HA, de Vries RP: **Spatial and developmental differentiation of mannitol dehydrogenase and mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus niger*.** Eukaryot Cell. 2010 Sep;9(9):1398-402. Epub 2010 Mar 19.

Akamatsu H, Taga M, Kodama M, Johnson R, Otani H and Kohmoto K: **Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins.** Curr. Genet. 1999, 35: 647-656.

Angus JF, Gardner PA, Kirkegaard JA and Desmarchelier JM: **Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus.** Plant and Soil 1994, Volume 162, Number 1, 107-112, DOI: 10.1007/BF01416095

Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O.: **Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*.** BMC Genomics. 2010 Jan 15;11:32.

Avenot H, Simoneau P, Iacomi-Vasilescu B, Bataillé-Simoneau N: **Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene *AbNIK1* from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance.** Phytopathology. 2008 Jun;98(6):736-42

Awasthi YC, Yang Y, Tiwari NK, Patrick B, Sharma A, Li J, Awasthi S: **Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases.** Free Radic Biol Med. 2004 Sep 1;37(5):607-19.

## -B-

Bai M, Zhou JM, Perrett S: **The yeast prion protein *Ure2* shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms.** J Biol Chem. 2004 Nov 26;279(48):50025-30. Epub 2004 Sep 15

Beevi SS, Mangamoori LN, Dhand V, Ramakrishna DS: **Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *Raphanus sativus* L.** Foodborne Pathog Dis. 2009 Jan-Feb;6(1):129-36.

Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A, Schulze-Lefert P: **A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense.** Science. 2009 Jan 2;323(5910):101-6. Epub 2008 Dec 18.

Berto P, Belingheri L and Dehorter B: **Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*.** Biotechnol. Lett. 1997, 19: 533-536.

Berto P, Comménil P, Belingheri L and Dehorter B: **Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflowers leaves.** FEMS Microbiol. Lett. 199, 180: 183-189.

Bokocho GM: **Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins.** Current Opinion in Cell Biology Volume 6, Issue 2, April 1994, Pages 212-218

Boucher V, Buitink J, Lin X, Boudet J, Hoekstra FA, Hundertmark M, Renard D, Leprince O: **MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins.** Plant Cell Environ. 2010 Mar;33(3):418-30. Epub 2009 Nov 25.

Bock CH, Thrall PH, Burdon JJ: **Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination.** Mycol Res. 2005 Feb;109(Pt 2):227-36.

Brader G, Mikkelsen MD, Halkier BA, Tapio Palva E: **Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants.** Plant J. 2006 Jun;46(5):758-67.

Bressan M, Roncato MA, Bellvert F, Comte G, Haichar FZ, Achouak W, Berge O: **Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots.** ISME J. 2009 Nov;3(11):1243-57. Epub 2009 Jun 25.

Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun TH, Balk L, Wiklund R, Eriksson J, Jansson C, Persson B, Jakobsson PJ, Morgenstern R : **Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily.** FEBS J. 2005 Apr;272(7):1688-703.

Brown KK, Cox AG, Hampton MB: **Mitochondrial respiratory chain involvement in peroxiredoxin 3 oxidation by phenethyl isothiocyanate and auranofin.** FEBS Lett. 2010 Mar 19;584(6):1257-62. Epub 2010 Feb 19.

Burns C, Geraghty R, Neville C, Murphy A, Kavanagh K, Doyle S : **Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*.** Fungal Genet Biol. 2005 Apr; 42(4):319-27.

-C-

Cha CJ, Kim SJ, Kim YH, Stingley R, Cerniglia CE: **Molecular cloning, expression and characterization of a novel class glutathione S-transferase from the fungus *Cunninghamella elegans*.** Biochem J. 2002 Dec 1;368(Pt 2):589-95.

Champion R : **Identifier les Champignons Transmis par les Semences.** 1997, Paris, France: INRA

Chaturvedi V, Flynn T, Niehaus WG, Wong B: **Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*.** Microbiology 1996a, 142: 937-943.

Chaturvedi V, Wong B, Newman SL: **Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates.** J Immunol 1996, 156(10):3836-3840.

Chaturvedi V, Bartiss A, Wong B: **Expression of bacterial mtID in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress.** J Bacteriol. 1997 Jan;179(1):157-62.

Cho Y, Davis JW, Kim KH, Wang J, Sun QH, Cramer RA and Lawrence CB: **A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs.** Mol. Plant Microbe-Interact. 2007, 19: 7-15.

Choi JH, Lou W, Vancura A: **A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** J Biol Chem. 1998 Nov 6;273(45):29915-22.

Choudhary BR, Joshi P and Ramarao S: **Interspecific hybridization between *Brassica carinata* and *Brassica rapa*.** Plant Breeding, 2000, **119**: 417-420.

Chrungu B, Verma N, Mohanty A, Pradhan A and Shivanna KR: **Production and characterization of interspecific hybrids between *Brassica maurorum* and crop brassicas.** Theor. Appl. Genet. 1999, **98**: 608-613

Clark AJ, Blissett KJ, Oliver RP: **Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyper-osmotic stress and in planta.** Planta 2003, 216(4):614-619.

Conn KL, Browne LM, Tewari JP and Ayer WA: **Resistance to *Rhizoctonia solani* and presence of antimicrobial compounds in *Camelina sativa* roots.** J. Plant Biochem. Biotechnol. 1994, **3**:125–130.

Costenoble R, Adler L, Niklasson C, Liden: **Engineering of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic production of mannitol.** FEMS Yeast Res 2003, 3:17-25.

Cramer RA, Lawrence CB: **Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed in planta during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*.** Fungal Genet Biol 2004, 41(2):115-128.

Cramer RA, Wang J, Davis J and Lawrence C: **Cloning and Characterization of a Cyanide Hydratase from the Necrotropic Fungal Pathogen *Alternaria brassicicola*.** Fung. Genet 2005, Newslett . 52.

Cramer RA, LA Rota CM, Cho Y, Thon M, Craven KD, Knudson DL, Mitchell TK, Lawrence CB: **Bioinformatic analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Alternaria brassicicola*-*Brassica oleracea* interaction.** Mol Plant Pathol. 2006 Mar 1;7(2):113-24.

-D-

Dawson GW, Hick AJ, Bennett RN, Donald A, Pickett JA, Wallsgrove RM: **Synthesis of glucosinolate precursors and investigations into the biosynthesis of phenylalkyl- and methylthioalkylglucosinolates.** J Biol Chem. 1993 Dec 25;268(36):27154-9.

Danyelle M Townsend<sup>1</sup> and Kenneth D Tew Oncogene: **The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance.** (2003) 22, 7369–7375. doi:10.1038/sj.onc.1206940.

De Jong JC, McCormack BJ, Smirnoff N, and Talbot NJ: **Glycerol generates turgor in rice blast.** Nature 389 1997, 244–245.

Dongo A, Bataillé-Simoneau N, Champion C, Guillemette T, Hamon B, Iacomi-Vasilescu B, Katz L, Simoneau P : **The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide ambruticin.** Appl Environ Microbiol. 2009 Jan;75(1):127-34. Epub 2008 Nov 14.



Dixon KP, Xu JR, Smirnov N, Talbot NJ: **Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea***. *Plant Cell* 1999, 11(10):2045-2058.

Dugé de Bernonville : **Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions incompatibles entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, et le pommier (*Malus X domestica*)**. Thèse de doctorat université d'Angers 2009

Dulermo T, Rasclé C, Chinnici G, Gout E, Bligny R, Cotton P: **Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: from plant hexoses to mannitol**. *New Phytol.* 2009;183(4):1149-62. Epub 2009 Jun 4.

Dulermo T, Rasclé C, Billon-Grand G, Gout E, Bligny R, Cotton P: **Novel insights into mannitol metabolism in the fungal plant pathogen *Botrytis cinerea***. *Biochem J.* 2010 Mar 29;427(2):323-32.

Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P: **The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator**. *J Biol Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3319-23. Epub 2000 Oct 16.

-E-

Eaton DL, Bammler TK: **Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology**. *Toxicol Sci.* 1999 Jun;49(2):156-64. Review. No abstract available.

Egan MJ, Wang ZY, Jones MA, Smirnov N, Talbot NJ : **Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 10;104(28):11772-7. Epub 2007 Jun 28

Ernst R, Klemm R, Schmitt L, Kuchler K: **Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps**. *Methods Enzymol.* 2005;400:460-84.

-F-

Fan CY and Köller W: **Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: differential and sequential expression of cutinolytic esterases by *Alternaria brassicicola***. *FEMS Microbiol.* 1998 Lett. 158: 33-38.

Farmer EE, Davoine C: **Reactive electrophile species**. *Curr Opin Plant Biol.* 2007 Aug;10(4):380-6. Epub 2007 Jul 23. Review

FEBS J. 2009 Dec;276(24):7412-28. **Substrate specificity and inhibition of brassinin hydrolases, detoxifying enzymes from the plant pathogens *Leptosphaeria maculans* and *Alternaria brassicicola***. Pedras MS, Minic Z, Sarma-Mamillapalle VK. Department of Chemistry, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada. s.pedras@usask.ca.

Fenwick G, Heaney R, Mullin W: **Glucosinolates and their breakdown products in food and food plant**. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1983, 18: 123-201.

Fernández-Cañón JM, Peñalva M : **Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue**. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):329-37.

Ferrer C, Muñoz G, Alió JL, Abad JL, Colom F: **Polymerase chain reaction diagnosis in fungal keratitis caused by *Alternaria alternata***. *Am J Ophthalmol.* 2002 Mar;133(3):398-9.

Fillinger S, Chaverocche MK, van Dijck P, de Vries R, Ruijter G, Thevelein J, d'Enfert C: **Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans***. *Microbiology*. 2001 Jul;147(Pt 7):1851-62.

Foster AJ, Jenkinson JM, Talbot NJ.: **Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea***. *EMBO J*. 2003 Jan 15;22(2):225-35.

Francis F, Vanhaelen N, Haubruge E: **Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid**. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2005 Mar;58(3):166-74.

Fraser JA, Davis MA, Hynes MJ: **A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance**. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jun;68(6):2802-8.

Frova C: **Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives**. *Biomol Eng*. 2006 Sep;23(4):149-69. Epub 2006 Jun 10.

-G-

Garcerá A, Barreto L, Piedrafita L, Tamarit J, Herrero E: ***Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases**. *Biochem J*. 2006 Sep 1;398(2):187-96.

Gloer JB, Poch GK, Short DN, McCloskey DV : **Structure of brassicicolin A: a novel isocyanide antibiotic from the phylloplane fungus *Alternaria brassicicola***. *J. Org. Chem.*, 1988, 53 (16), pp 3758–3761.

GREENHALGH JR, MITCHELL ND: **THE INVOLVEMENT OF FLAVOUR VOLATILES IN THE RESISTANCE TO DOWNY MILDEW OF WILD AND CULTIVATED FORMS OF BRASSICA OLERACEA**. *New Phytologist* Volume 77, Issue 2, pages 391–398, September 1976

-H-

Halkier BA, Gershenzon J: **Biology and biochemistry of glucosinolates**. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:303-33. Review.

Hansen LN and Earle ED: **Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc.** *Theor. Appl. Genet.*, 1997, **94**: 1078-1085.

Hansen LN: **Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camela sativa* (L.) Crantz**. *Euphytica*, 1998, 104: 173-179.

Hasegawa K, Miwa S, Tsutsumiuchi K, Miwa J: **Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor**. *PLoS One*. 2010 Feb 17;5(2):e9267.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR: **Glutathione transferases**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.

Hemingway JS Kimber D., Mc Gregor D.I: **The mustard species: condiment and food ingredient use and potential as oilseed crops**, 1995, pp. 373-383. (Eds.) *Brassica Oilseeds*. CAB International, Wallingford, U.K.

Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, and Turner JN: **Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls**. *Mycologia* 2005, 97: 580–588.



Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJ: **Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions.** *Annu Rev Entomol.* 2009;54:57-83. Hult K, Gatenbeck S: **Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternata*.** *Eur J Biochem* 1978, 88(2):607-612.

Horikoshi K, Iida S, Ikeda Y: **Mannitol and mannitol dehydrogenase in conidia of *Aspergillus oryzae*.** *Journal of Bacteriology*, 1965 Vol 89, N°2.

Hulo N, Sigrist CJ, Le Saux V, Langendijk-Genevaux PS, Bordoli L, Gattiker A, De Castro E, Bucher P, Bairoch A: **Recent improvements to the PROSITE database.** *Nucleic Acids Res* 2004, 32(Database issue):D134-137.

Hult K, Veide A, Gatenbeck S: **The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species.** *Arch Microbiol* 1980, 128(2):253-255.

-I-

Iacomi-Vasilescu B, Avenot H, Bataille-Simoneau N, Laurent E, Guénard M, Simoneau P: **In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles.** *Crop Protection*, 2004, pages 481-488

Iacomi-Vasilescu B, Bataille-Simoneau N, Campion C, Dongo A, Laurent E, Serandat I, Hamon B, Simoneau P: **Effect of null mutations in the *AbNIK1* gene on saprophytic and parasitic fitness of *Alternaria brassicicola* isolates highly resistant to dicarboximide fungicides.** *Plant Pathology* Volume 57, Issue 5, pages 937–947, October 2008.

Idnurm A, and Howlett BJ: **Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi.** *Mol. Plant Pathol.* 2001, 2: 241–255.

Igarashi, Y, Ogawa M, Saito N, Yoshida R, Kunoh H, Onaka H and Furumai T: **Fistupyronone, a novel inhibitor of the infection of chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp.** TP-A-0569. *J. Antibiot.* 2000, **53**: 1117-1122.

Inderjit, Bajpai D, Rajeswari MS: **Interaction of 8-hydroxyquinoline with soil environment mediates its ecological function.** *PLoS One.* 2010 Sep 21;5(9):e12852.

Ishikawa T, Li ZS, Lu YP, Rea PA: **The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression.** *Biosci Rep.* 1997 Apr;17(2):189-207. Review.

-J-

Jennings DB, Ehrenshaft M, Pharr DM, Williamson JD: **Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(25):15129-15133.

Jennings DB, Daub ME, Pharr DM, Williamson JD: **Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*.** *Plant J* 2002, 32(1):41-49.

Joubert A, Bataille-Simoneau N, Campion C, Guillemette T, Hudhomme P, Iacomi-Vasilescu B, Leroy T, Pochon S, Poupard P and Simoneau P: **Cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways are required for adaptation of *Alternaria brassicicola* to cell wall stress caused by brassicaceous indolic phytoalexins** *Cellular Microbiology* 2011a, doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01520.x

Joubert A, Simoneau P, Campion C, Bataillé-Simoneau N, Iacomi-Vasilescu B, Poupard P, François JM, Georgeault S, Sellier E, Guillemette T : **Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola***. Mol Microbiol. 2011b Mar;79(5):1305-24. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07522.x. Epub 2011 Jan 20.

Juchaux-Cachau M, Landouar-Arsivaud L, Pichaut JP, Campion C, Porcheron B, Jeauffre J, Noiraud-Romy N, Simoneau P, Maurousset L, Lemoine R: **Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells**. Plant Physiol. 2007 Sep;145(1):62-74. Epub 2007 Jul 13.

-K-

Kagan IA, Hammerschmidt R: **Arabidopsis ecotype variability in camalexin production and reaction to infection by *Alternaria brassicicola***. J Chem Ecol 2002, 28(11):2121-2140.

Kamii E, Isshiki K: **Antimicrobial efficacy of benzyl isothiocyanate**. [Article in Japanese] Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2009 Dec;50(6):311-4.

Keck AS, Finley JW: **Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium**. Integr Cancer Ther. 2004 Mar;3(1):5-12. Review.

Kim HG, Kim BC, Kim K, Park EH, Lim CJ: **Transcriptional regulation of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding glutathione S-transferase I by a transcription factor Pap1**. J Microbiol. 2004 Dec;42(4):353-6.

Kjæ A: **isoThiocyanates XXXV. Miscellaneous isothiocyanate glucoside acetates**. Acta Chemica Scandinavica 1959, 13, pp. 851–852

Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N: **Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H<sup>+</sup>-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose**. Plant Cell 2005, 17(1):204-218.

Kliebenstein DJ: **Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses**. Plant Cell Environ. 2004, 27: 675–684.

Knogge W: **Fungal infection of plants**. Plant Cell, 1996, 8: 1711-1722

Kolte SJ and Awasthi RP: **Duvia mustard: a useful source to create *Alternaria* black spot tolerant dwarf varieties of oilseed *brassic*s**. Plant Var. Seeds, 2000, 13: 107-111.

Koonin EV, Mushegian AR, Tatusov RL, Altschul SF, Bryant SH, Bork P, Valencia A: **Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain--study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling**. Protein Sci. 1994 Nov;3(11):2045-54.

Kuzniak E and Urbanek H: **The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses**. Acta physiologiae plantarum, 2000; Vol.22 (2), 195-203

-L-

Lara-Ortíz T, Riveros-Rosas H, Aguirre J: **Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans***. Mol Microbiol. 2003 Nov;50(4):1241-55.

Lebeda A, Luhová L, Sedlářová M, Jancova D: **The role of enzymes in plant-fungal pathogen interactions**. Z. Pflanzenk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot. 2001, 108: 89–111.

Lee JK, Koo BS, Kim SY, Hyun HH: **Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from a newly isolated strain of *Candida magnoliae***. Appl Environ Microbiol 2003, 69(8):4438-4447.

Lewis DH, Smith DC: **Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism**. New Phytol, 1967, 66:143-184

Lowea RGT, Lorda M, Rybaka K, Trengoveb RD, Olivera RP, and Solomond PS : **Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum***. Fungal Genetics and Biology Volume 46, Issue 5, May 2009, Pages 381-389.

Lu WD, Atkins WM: **A novel antioxidant role for ligandin behavior of glutathione S-transferases: attenuation of the photodynamic effects of hypericin**. Biochemistry. 2004 Oct 12;43(40):12761-9

-M-

Ma XX, Jiang YL, He YX, Bao R, Chen Y, Zhou CZ: **Structures of yeast glutathione-S-transferase Gtt2 reveal a new catalytic type of GST family**. EMBO Rep. 2009 Dec;10(12):1320-6. Epub 2009 Oct 23.

Malagnac F, Lalucque H, Lepère G, Silar P: **NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina***. Fungal Genet Biol. 2004 Nov;41(11):982-97.

Maude R & Humpherson-jones F: **Studies on the seed-borne phase of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and grey leaf spot (*Alternaria brassicae*) of brassicas**. Ann Appl Biol 1980, 95: 311-319.

Mariani D, Mathias CJ, da Silva CG, Herdeiro Rda S, Pereira R, Panek AD, Eleutherio EC, Pereira MD: **Involvement of glutathione transferases, Gtt1 and Gtt2, with oxidative stress response generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during growth of *Saccharomyces cerevisiae***. Redox Rep. 2008;13(6):246-54.

Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V: **A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2***. Nature. 1995 Jun 1;375(6530):397-400.

Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F: **The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE)**. Embo J 1996, 15(9):2227-2235.

May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV, Inzé D: **Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development**. Journal of Experimental Botany, 1998 Volume49, Issue321 Pp. 649-667.

McGoldrick S, O'Sullivan SM, Sheehan D : **Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily**. FEMS Microbiol Lett. 2005 Jan 1;242(1):1-12.

Mithena RF, Lewisa BG, Heaneyb RK and Fenwickb GR: **Resistance of leaves of Brassica species to *Leptosphaeria maculans*** Transactions of the British Mycological Society. Volume 88, Issue 4, June 1987, Pages 525-531

Morel M, Ngadin AA, Droux M, Jacquot JP, Gelhaye E: **The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.** Cell Mol Life Sci. 2009 Dec;66(23):3711-25. Epub 2009 Aug 7.

Morrison VA, Weisdorf DJ: ***Alternaria*: a sinonasal pathogen of immunocompromised hosts.** Clin Infect Dis. 1993 Feb;16(2):265-70.

Mukherjee AK, Carp MJ, Zuchman R, Ziv T, Horwitz BA, Gepstein S: **Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*.** J Proteomics. 2010 Feb 10;73(4):709-20. Epub 2009 Oct 24.

Musiol R, Serda M, Hensel-Bielowka S, Polanski J: **Quinoline-based antifungals.** Curr Med Chem. 2010;17(18):1960-73.

Muto M, Mulabagal V, Huang HC, Takahashi H, Tsay HS, Huang JW: **Toxicity of black nightshade (*Solanum nigrum*) extracts on *Alternaria brassicicola*, causal agent of black leaf spot of Chinese cabbage.** J. Phytopathology 2006, **154**: 45-50.

-N-

Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R: **Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem.** Plant Cell 2001, 13(3):695-705.

-O-

Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Kim YS, Lee JE, Kang NY, Lee S, Cheong H, Park OK: **Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*.** Plant Cell 2005, 17(10):2832-2847.

Oka K, Akamatsu H, Kodama M, Nakajima H, Kawada T and Otani H: **Host-specific AB-toxin production by germinating spores of *Alternaria brassicicola* is induced by a host-derived oligosaccharide.** Physiol. Mol. Plant Pathol 2005, 66: 12-19.

Östling J, Ronne H: **Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in absence of glucose.** Eur. J. Biochem 1997, 252, 162-168.

Otani H, Kohmoto K and Komada M: ***Alternaria* toxins and their effects on host plants.** Can. J. Bot. 1995, 73: 453-458.

Otani H, Kohno A, Kodama M and Kohmoto K: **Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*.** Physiol. Mol. Plant Pathol. 1998, 52: 285-295.

-P-

Parent C, Capelli N, Dat J : **Reactive oxygen species, stress and cell death in plants.** C R Biol. 2008 Apr;331(4):255-61. Epub 2008 Mar 5. Review. French.

Pedras MS, Okinyo-Owiti DP, Thoms K, Adio AM : **The biosynthetic pathway of crucifer phytoalexins and phytoanticipins: de novo incorporation of deuterated tryptophans and quasi-natural compounds.** Phytochemistry. 2009 Jun;70(9):1129-38. Epub 2009 Jun 26.

Pedras MS, Minic Z, Sarma-Mamillapalle VK : **Synthetic inhibitors of the fungal detoxifying enzyme brassinin oxidase based on the phytoalexin camalexin scaffold.** J Agric Food Chem. 2009 Mar 25;57(6):2429-35.

Pedras MS, Chumala PB, Jin W, Islam MS, Hauck DW: **The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: phytotoxin production and phytoalexin elicitation.** *Phytochemistry*. 2009 Feb;70(3):394-402. Epub 2009 Feb 14.

Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala A, Metraux JP, Manners JM, Broekaert WF: **Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway.** *Plant Cell* 1996, 8(12):2309-2323.

Perfect JR, Rude TH, Wong B, Flynn T, Chaturvedi V, Niehaus W: **Identification of a *Cryptococcus neoformans* gene that directs expression of the cryptic *Saccharomyces cerevisiae* mannitol dehydrogenase gene.** *J Bacteriol.* 1996 Sep;178(17):5257-62.

Pfyffer G, Pfyffer BU, Rast DM: **The polyol pattern, chemotaxonomy, and phylogeny of the fungi.** *Sydowia* 1986, 39:160-201

Pichard B and Thouvenot D: **Effect of *Bacillus polymyxa* seed treatment on control of black -rot and damping off of cauliflower.** *Seed Sci. Technol.* 1999, **27**: 455-465.

Price A, Lucas PW and LEA PJ: **Age Dependent Damage and Glutathione Metabolism in Ozone Fumigated Barley: A Leaf Section Approach.** *Journal of Experimental Botany*, 1990 Volume41, Issue10 Pp. 1309-1317.

Privalsky ML: **Depudecin makes a debut.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 3335–3337.

-Q-

Quain DE, Boulton CA: **Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Gen Microbiol.* 1987 Jul;133(7):1675-84.

-R-

Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G: **Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets.** *BMC Plant Biol.* 2009 Mar 13;9:28.

Rahmanpour S, Backhouse D and Nonhebel HM: **Reaction of glucosinolate-myrosinase defence system in Brassica plants to pathogenicity factor of *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Ramstedt U, Serhan CN, Nicolaou KC, Webber SE, Wigzell H, Samuelsson B: **Lipoxin A-induced inhibition of human natural killer cell cytotoxicity: studies on stereospecificity of inhibition and mode of action.** *J Immunol* 1987, 138(1):266-270.

Rogers EE, Glazebrook J and Ausubel FM: **Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions.** *Mol Plant Microbe Interact* 1996, **9**, 748-757.

Ruijter GJG, Bax M, Patel H, Flitter SJ, van der Vondervoort, PJI, de Vries RP, van Kuyk PA and Visser J: **Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores.** *Eucaryotic Cell* 2003, 690-698.

-S-

Saharan, GS: **Disease resistance.** In: *Breeding Oilseed Brassicas*, pp. 1993, 3842-3846. Labana K.S., Banga S.S., Banga S.K. (Eds.) Springer-Verlag, Berlin.

Sarwar M and Kirkegaard JA: **Biofumigation potential of brassicas. II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolates production and implications for screening.** *Plant Soil* 201, 1998, 91–101.

Schell WA: **Unusual fungal pathogens in fungal rhinosinusitis.** *Otolaryngol Clin North Am.* 2000 Apr;33(2):367-73.

Schenk PM, Kazan K, Manners JM, Anderson JP, Simpson RS, Wilson IW, Somerville SC, Maclean DJ: **Systemic gene expression in Arabidopsis during an incompatible interaction with Alternaria brassicicola.** *Plant Physiol* 2003, 132(2):999-1010.

Schmuck E, Cappello J, Coggan M, Brew J, Cavanaugh JA, Blackburn AC, Baker RT, Eyre HJ, Sutherland GR, Board PG: **Deletion of Glu155 causes a deficiency of glutathione transferase Omega 1-1 but does not alter sensitivity to arsenic trioxide and other cytotoxic drugs.** *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40:2553–2559

Sellam A, Poupard P, Simoneau P: **Molecular cloning of AbGst1 encoding a glutathione transferase differentially expressed during exposure of Alternaria brassicicola to isothiocyanates.** *FEMS Microbiol Lett* 2006, 258(2):241-249.

Sellam A, Dongo A, Guillemette T, Hudhomme P, Simoneau PS: **Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl isothiocyanate in the necrotrophic fungus Alternaria brassicicola.** *Molecular Plant Pathology* 2007, 8(2), 195-208.

Sexton AC, Howlett BJ: **Characterisation of a cyanide hydratase gene in the phytopathogenic fungus Leptosphaeria maculans.** *Mol Gen Genet.* 2000 Apr;263(3):463-70.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA: **Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily.** *Biochem J.* 2001 Nov 15;360(Pt 1):1-16. Review.

Sharma AK, Gupta JS and Maheshwari RK: **The relationship of Streptomyces arabicus to Alternaria brassicae (Berk.) Sacc. and Alternaria brassicicola (Schew.) Wiltshire on the leaf surface of yellow sarson and taramira.** *Geobios New Reports*, 1984, 3: 83-84.

Sharma TR and Singh BM: **Transfer of resistance to Alternaria brassicae in Brassica juncea through interspecific hybridization among Brassicas.** *J. Genet. Breed.*, 1992, 46: 373-378.

Sharma KG, Mason DL, Liu G, Rea PA, Bachhawat, A.K. and Michaelis, S. **Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a Saccharomyces cerevisiae MRP-type ABC transporter.** *Eukaryot. Cell*, 2002, 1: 391-400.

Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ: **Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts.** *Plant Physiol* 1997, 113(4):1177-1183.

Sivapalan A and Browning JW: **Incidence of Alternaria brassicicola (Schw.) Wiltsh. on Brassica oleracea seeds.** *Aust. J. Expt'l. Agric.*, 1992, 32: 535-537.

Smirnoff N, Cumes QJ: **Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes.** *Phytochemistry*, 1989, 28:1057-1060

Smolinska, U, Morra MJ and Knudsen GR: **Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of Fusarium oxysporum.** *Plant Disease*, 2003, 87: 407-412.

Solomon PS, Tan KC, Oliver RP: **Mannitol 1-phosphate metabolism is required for sporulation in planta of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum***. *Mol Plant Microbe Interact* 2004, 18(2):110-115.

Solomon PS, Tan KC, Oliver RP: **Mannitol 1-phosphate metabolism is required for sporulation in planta of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum***. *Mol Plant Microbe Interact* 2005, 18(2):110-115.

Solomon PS, Waters OD, Jorgens CI, Lowe RG, Rechberger J, Trengove RD, Oliver RP: **Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch)**. *Biochem J* 2006, 399(2):231-239.

Sołowiej E, Kasprzycka-Guttman T, Fiedor P, Rowiński W: **Chemoprevention of cancerogenesis--the role of sulforaphane**. *Acta Pol Pharm*. 2003 Jan-Feb;60(1):97-100.

Stergiopoulos I, Zwiers LH, De Waard MA: **Secretion of Natural and Synthetic Toxic Compounds from Filamentous Fungi by Membrane Transporters of the ATP-binding Cassette and Major Facilitator Superfamily**. *Euro. J. Plant Pathol*. 2002, 108 : 719-734.

Strandberg GW: **D-mannitol metabolism by *Aspergillus candidus***. *J Bacteriol* 1969, 97(3):1305-1309.

Stoop JM et Mooibroek H: **Cloning and characterization of NADP-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom, *Agaricus bisporus*, and its expression in response to NaCl stress**. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64:4689-96.

Suárez JE, Mendoza MC: **Plasmid-encoded fosfomycin resistance**. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 May;35(5):791-5.

-T-

Tew KD, Ronai Z: **GST function in drug and stress response**. *Drug Resist Updat*. 1999 Jun;2(3):143-147.

Tewari, J.P: **Structural and biochemical bases of the blackspot disease of crucifers**. *Adv. Struct. Biol.*, 1991, 1: 325-349.

Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF: **Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(25):15107-15111.

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K: **Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential**. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2003, 3(1):1-8.

Thompson S, Croft NJ, Sotiriou A, Piggins HD, Crosthwaite SK: ***Neurospora crassa* heat shock factor 1 is an essential gene; a second heat shock factor-like gene, *hsf2*, is required for asexual spore formation**. *Eukaryot Cell*. 2008 Sep;7(9):1573-81. Epub 2008 Jun 27.

Tierens KF, Thomma BP, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue BP, Broekaert WT: **Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens**. *Plant Physiol* 2001, 125:1688-1699.

Todorova TT: **Glutathione S-transferases and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae***. These de doctorat 2007

Torres MA, Jones JD, Dangl JL : **Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana***. *Nat Genet.* 2005 Oct;37(10):1130-4. Epub 2005 Sep 18.

Torres MA, Jones JD, Dangl JL: **Reactive oxygen species signaling in response to pathogens**. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):373-8. No abstract available.

Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A: **STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis**. *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):5811-20. Epub 2003 Nov 5.

Tulha J, Lima A, Lucas C, Ferreira C : **Saccharomyces cerevisiae glycerol/H<sup>+</sup> symporter Stl1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential is given**. *Microb Cell Fact.* 2010 Nov 3;9:82.

Tsuji J, Jackson EP, Gage DA, Hammerschmidt R, Somerville SC: **Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae***. *Plant Physiol.* 1992 Apr;98(4):1304-9.

-U-

Unkles SE, Duncan JM, Kinghorn JR: **Zinc fingerprinting for *Phytophthora* species: ZIF markers**. *Curr Genet* 1992, 22(4):317-318.

-V-

Valkonen JPT and Koponen H: **The seed-borne fungi of chinese cabbage (*Brassica perkinensis*), their pathogenicity and control**. *Plant Pathol.*, 1990, **39**: 510-516.

Vartivarian SE, Anaissie EJ, Cowart RE, Sprigg HA, Tingler MJ, Jacobson ES: **Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron**. *J Infect Dis.* 1993 Jan;167(1):186-90.

Veal EA, Toone WM, Jones N, Morgan BA: **Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe***. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):35523-31. Epub 2002 Jun 12.

Vélèz H, Glassbrook NJ, Daub ME: **Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata***. *Fungal Genet Biol* 2007, 44(4):258-268.

Vianello A, Zancani M, Macrí F : **Hydrogen peroxide formation and iron ion oxidoreduction linked to NADH oxidation in radish plasmalemma vesicles**. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Mar 30;1023(1):19-24

VIERHEILIG H and OCAMPO JA: **EFFECT OF ISOTHIOCYANATES ON GERMINATION OF SPORES OF *G. MOSSEAE***. *Soil Lol. Eiocium.* Vol. 22. No. 8. pp. 1161-1162. 1990

Voegelé RT, Hahn M, Lohaus G, Link T, Heiser I, Mendgen K: **Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae***. *Plant Physiol* 2005, 137(1):190-198.

Vuilleumier S, Pagni M: **The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes**. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Feb;58(2):138-46. Review.

-W-

Walton JD: **Deconstructing the plant cell wall**. *Plant Physiol.* 104, 1994: 1113-1118.



Wang Y and Casadevall A: **Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B.** *Antimicrob Agents Chemother* 1994, **38**, 2648-2650.

Warin R, Chambers WH, Potter DM, Singh SV: **Prevention of mammary carcinogenesis in MMTV-neu mice by cruciferous vegetable constituent benzyl isothiocyanate.** *Cancer Res.* 2009 Dec 15;69(24):9473-80. Epub .

Westman AL, Kresovitch S and Dickson MH: **Regional variation in *Brassica nigra* and other weedy crucifers for disease reaction to *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** *Euphytica*, 1999, **106**: 253-259.

Wicker CA, Sahu RP, Kulkarni-Datar K, Srivastava SK, Brown TL: **BITC Sensitizes Pancreatic Adenocarcinomas to TRAIL-induced Apoptosis.** *Cancer Growth Metastasis.* 2010 Jan 20;2009(2):45-55. PMID:20559452[PubMed].

Williamson JD, Guo WW, Pharr DM, 1998. **Cloning and characterization of genomic clone encoding mannitol dehydrogenase, a salt, sugar and SA regulated gene from celery (*Apium graveolens* L.).** *Plant Physiol.* 118: 329.

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM: **Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro.** *Anal Biochem.* 1999 May 15;270(1):41-9.

Witteveen CF, Visser J: **Polyol pools in *Aspergillus niger*.** *FEMS Microbiol Lett* 1995, 134(1):57-62.

Wu CL, Huang AC, Yang JS, Liao CL, Lu HF, Chou ST, Ma CY, Hsia TC, Ko YC, Chung JG: **Benzyl isothiocyanate (BITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC)-mediated generation of reactive oxygen species causes cell cycle arrest and induces apoptosis via activation of caspase-3, mitochondria dysfunction and Nitric Oxide (NO) in human osteogenic sarcoma U-2 OS cells.** *J Orthop Res.* 2011 Mar 4. doi: 10.1002/jor.21350. [Epub ahead of print]

-Y-

Yao C and Köller W: **Diversity of cutinases from plant patho-genic fungi: cloning and characterization of a cutinase gene from *Alternaria brassicicola*.** *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1994, 44: 81-92.

Yao C and Köller W: **Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicicola*.** *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1995, 8: 122-130.

-Z-

Zago MP, Mackenzie GG, Adamo AM, Keen CL, Oteiza PI: **Differential modulation of MAP kinases by zinc deficiency in IMR-32 cells: role of H(2)O(2).** *Antioxid Redox Signal.* 2005 Nov-Dec;7(11-12):1773-82.

Zang YX, Kim HU, Kim JA, Lim MH, Jin M, Lee SC, Kwon SJ, Lee SI, Hong JK, Park TH, Mun JH, Seol YJ, Hong SB, Park BS: **Genome-wide identification of glucosinolate synthesis genes in *Brassica rapa*.** *FEBS J.* 2009 Jul;276(13):3559-74. Epub 2009 May 18.

Zhang Y, Kolm RH, Mannervik B, Talalay P: **Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jan 17;206(2):748-55.

Zhang B, Wang X, Yang Y, Zhang X : **Extraction and identification of isothiocyanates from broccolini seeds.** Nat Prod Commun. 2011 Jan;6(1):65-6.

Zhou N, Tootle TL, Glazebrook J: **Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase.** Plant Cell. 1999 Dec;11(12):2419-28..

## Résumé

L'induction par un hôte d'un stress oxydatif chez un parasite représente l'une des stratégies de défense chimique les plus répandues. Chez les *Brassicacées*, famille de plantes comprenant des espèces à fort intérêt agronomique comme le chou ou le colza, ou d'intérêt scientifique comme *Arabidopsis thaliana*, le stress oxydatif peut être généré soit par des formes actives d'oxygène libérées au niveau de la zone d'agression lors du *burst* oxydatif soit par des molécules issues du métabolisme secondaire de la plante telles que les isothiocyanates (ITC). Bien que fortement exposé à un tel stress lors de l'infection, *Alternaria brassicicola*, champignon pathogène nécrotrophe inféodé aux Brassicacées, est capable d'accomplir son cycle parasitaire et donc de s'y adapter. Cette thèse met en évidence que la tolérance du champignon aux stress oxydatif est partiellement dépendante du métabolisme du mannitol qui participe à la résistance des conidies lors du *burst* oxydatif *in planta* ou à la protection contre les dommages intracellulaires des FAO générées par les ITC lors des phases précoces de l'interaction. Les travaux réalisés montrent également que la charge fongitoxique des dérivés des glucosinolates peut être inhibée par leur conjugaison au glutathion via des Glutathion-S-transférases (GST) spécifiques. L'altération du métabolisme du mannitol ou l'inactivation de ces GST diminue significativement le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* et la régulation de ces voies métaboliques est donc à considérer dans l'optique de développer de nouvelles stratégies de protection des cultures.

---

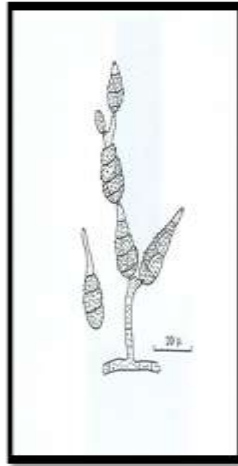
**Mots clefs :** *Alternaria brassicicola*, pouvoir pathogène, stress oxydatif, isothiocyanate, mannitol, glutathion-s-transférase

## Abstract

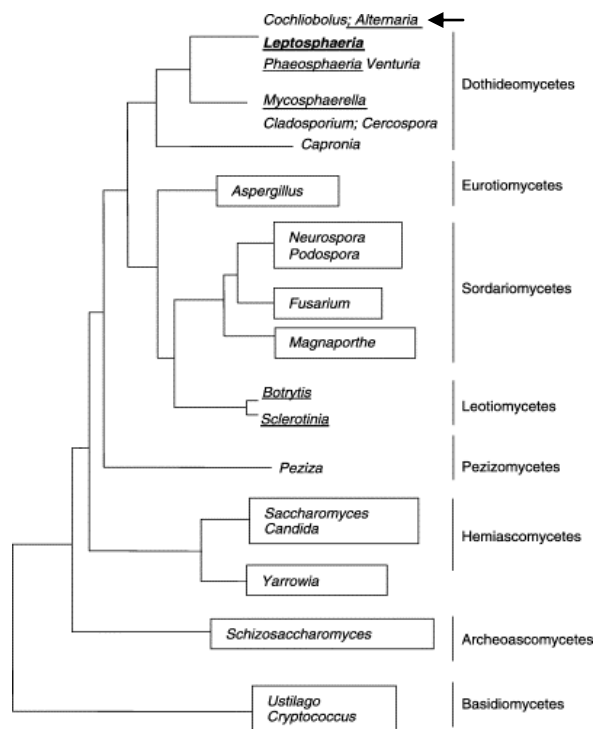
The induction of oxidative stress during infection plays a crucial role in host defense mechanisms. The plant family *Brassicaceae* includes many important crop plants and the model species *Arabidopsis thaliana*. Within this plant family, the oxidative stress can be generated either by reactive oxygen species (ROS) released around the infected area during the oxidative burst, or by plant secondary metabolites, such as isothiocyanates (ITC). The necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* is the causative agent of black spot disease of *Brassicaceae*. Despite this host defense system, this fungus is still able to complete its infectious disease cycle, indicating the existence of strategies to cope with this oxidative. In this study, we showed that oxidative stress tolerance of *A. brassicicola* was partly dependent on the mannitol metabolism, which was involved in conidial resistance during the *in planta* oxidative burst, and in protection against intracellular damages caused by ITC during the early step of infection. Our results also supported the potential involvement of Glutathion-S-transférase enzymes in ITC detoxification mechanisms. Alteration of mannitol metabolism or inactivation of selected GST resulted in reduced virulence indicating that their targeting would be an attractive option for antifungal strategies.

---

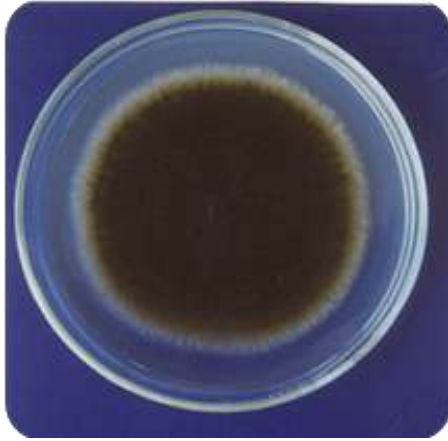
**Key words:** *Alternaria brassicicola*, Virulence, oxidative stress, isothiocyanate, mannitol, glutathion-s-transférase



**Figure 1:** Schéma de conidies d'*A. alternata* (<http://mycota-crcm.mnhn.fr>).



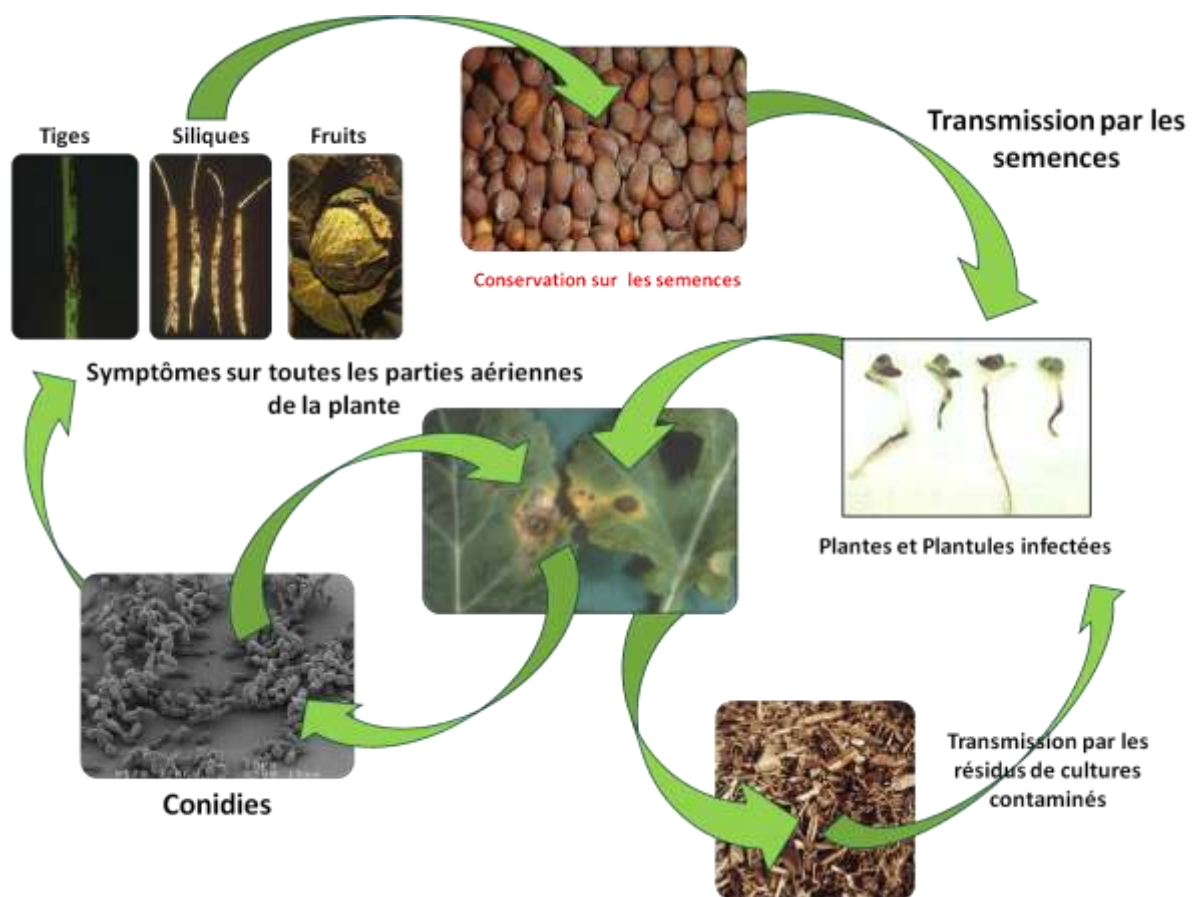
**Figure 2 :** Phylogénie des champignons ascomycètes déduite de l'analyse des séquences protéiques de la sous-unité 2 de l'ARN polymérase II (Rouxel et Balesdent, 2005). Le genre *Alternaria* (indiqué par une flèche) appartient à la classe des Dothideomycètes.



**Figure 3:** Culture d'*A. brassicicola* après 15 jours d'incubation à 24°C sur milieu solide malt-agar 2%.



**Figure 4:** conidies et conidiophores d'*A. brassicicola* (grossissement x1000).



**Figure 5** : Cycle infectieux d'*A. brassicicola*.

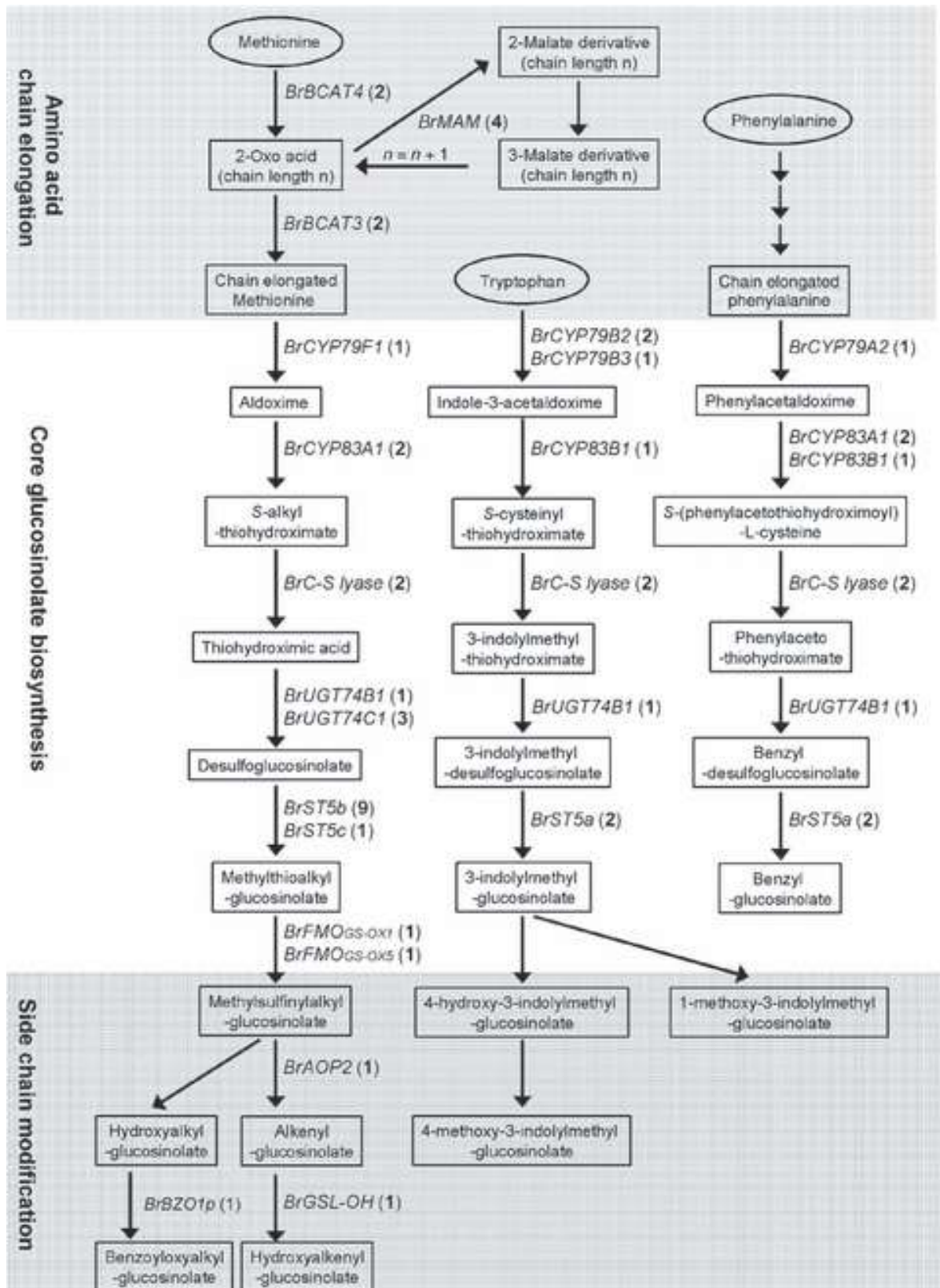
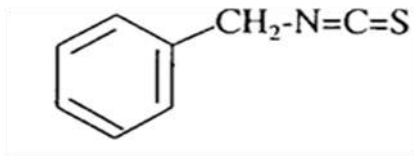
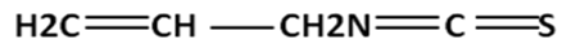


Figure 6 : Biosynthèse des trois groupes majeurs de glucosinolates chez *B. rapa* (Zang *et al.*, 2009).

a.

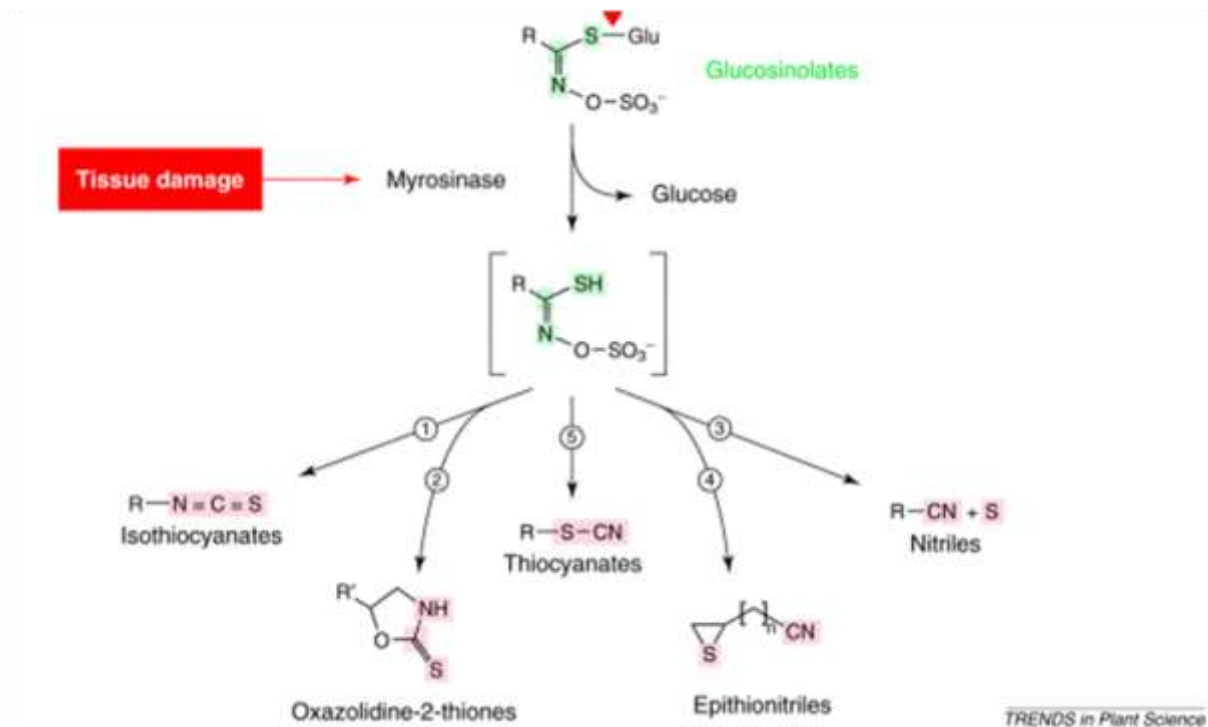


Benzyl-isothiocyanate



Allyl-isothiocyanate

b.

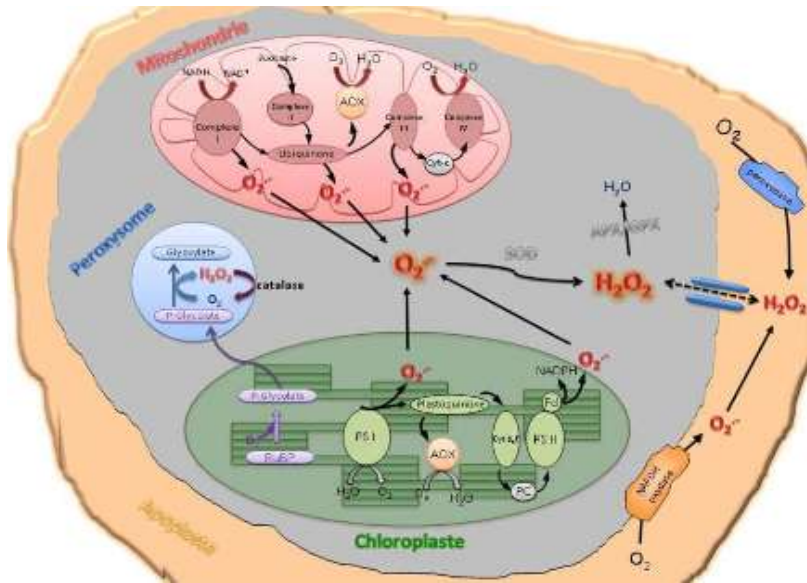


**Figure 7 :** (a), Structure chimique de deux types de glucosinolates (GS) (b), L'endommagement des tissus de la plante hôte abouti à l'hydrolyse des GS par la Myrosinase : la nature des produits résultants de l'hydrolyse des GS (①,②, ③, ④ et ⑤) dépend des conditions du milieu et de la structure chimique des glucosinolates.

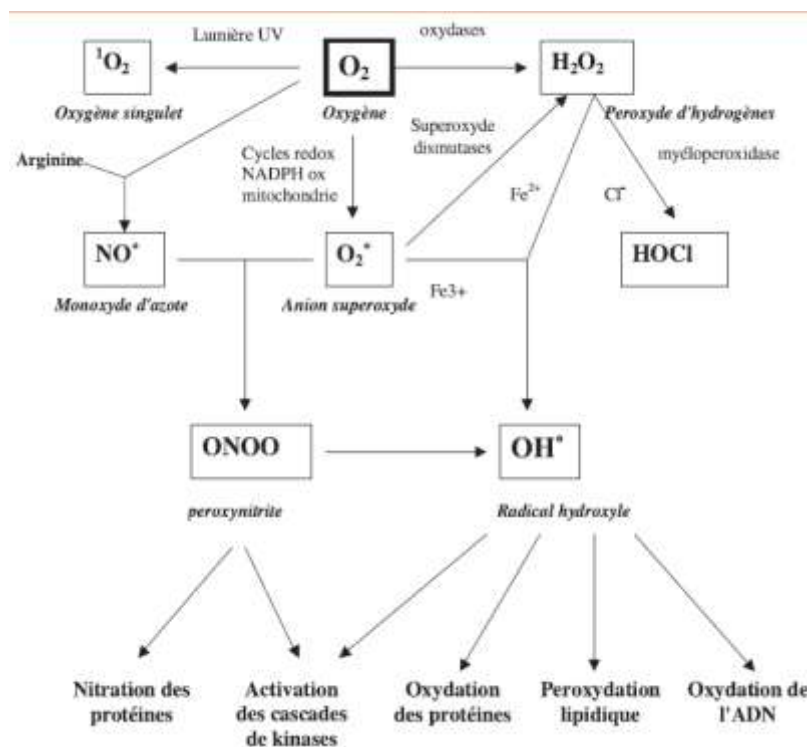


**Tableau 1:** Propriétés physico-chimiques des formes actives d'oxygène (FAO) (Ramel, 2009).

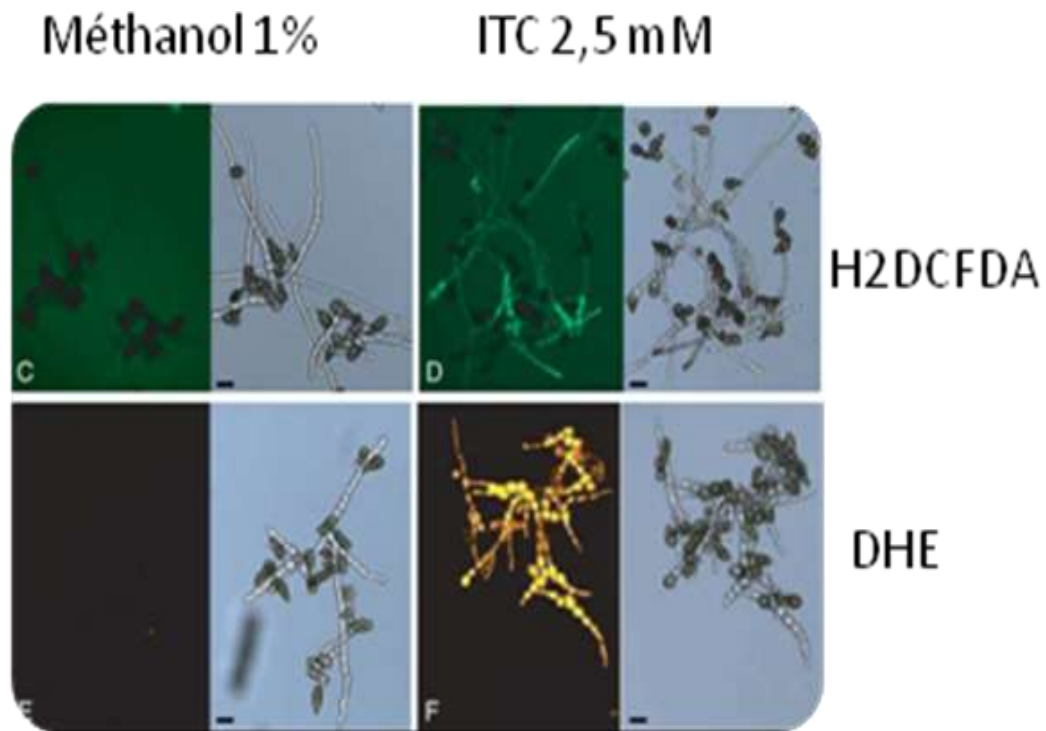
	Oxygène singulet	Radical superoxyde	Peroxyde d'hydrogène	Radical hydroxyle
<b>Formule</b>	$^1\text{O}_2$	$\text{O}_2^-$	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{OH}^\cdot$
<b>Configuration électronique</b>	O-O :	$^\cdot\text{O}-\text{O}:$	H : O-O : H	H:O $^\cdot$
<b>Propriétés des électrons</b>	électrons appariés	un électron non apparié	électrons appariés	un électron non apparié
<b>Demi-vie</b>	1 $\mu\text{s}$	1 $\mu\text{s}$	1 ms	1 ns
<b>Distance parcourue</b>	30 nm	30 nm	1 $\mu\text{m}$	1 nm
<b>Translocation à travers la membrane</b>	Oui si production importante	Non	Oui	Non



**Figure 8 :** Sites de production intra-organites des formes actives d'oxygènes (FAO) dans la cellule végétale (Parent *et al.*, 2008).



**Figure 9 :** Les différentes formes actives d'oxygènes et leurs conséquences sur la cellule (Favier *et al.*, 2003).



**Figure 10** : Détection des FAO intracellulaires dans les hyphes germinatifs chez *A. brassicicola* en présence d'Al-ITC (Sellam *et al.*, 2007a).

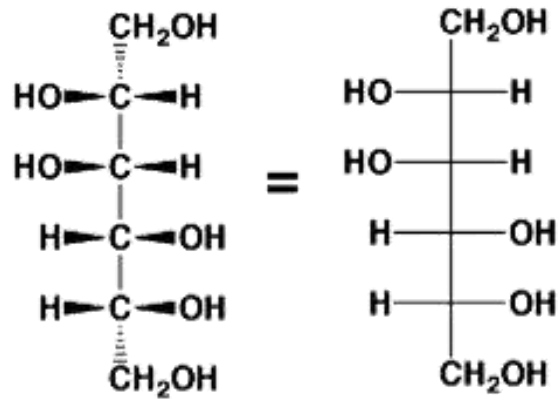


Figure 11 : Structure chimique du mannitol,  $C_6H_{14}O_6$

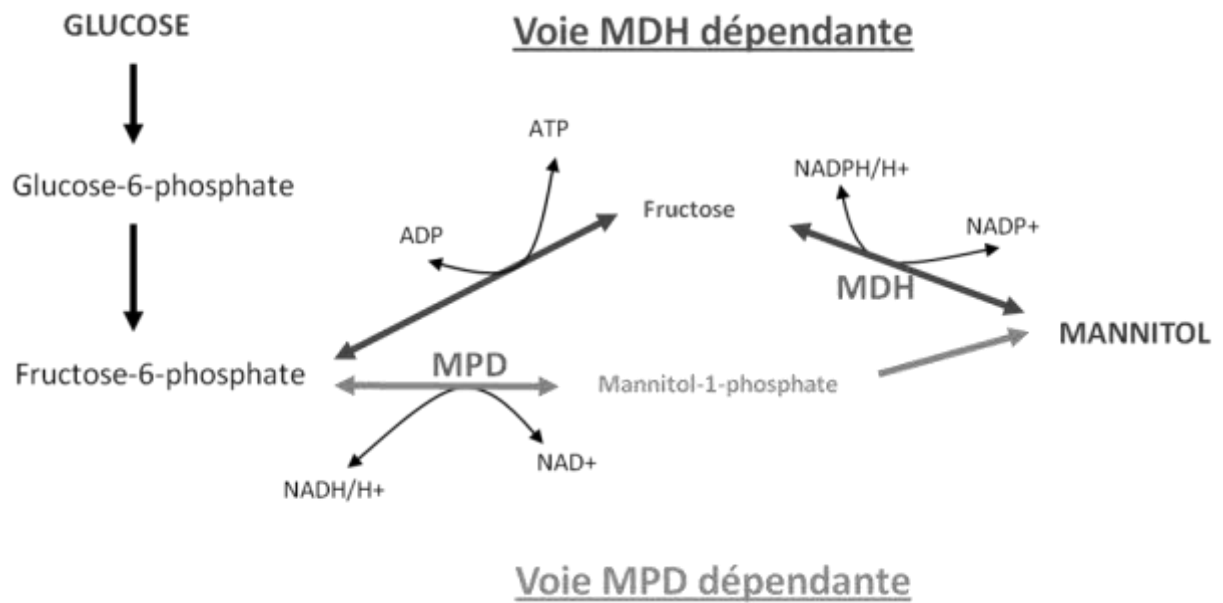
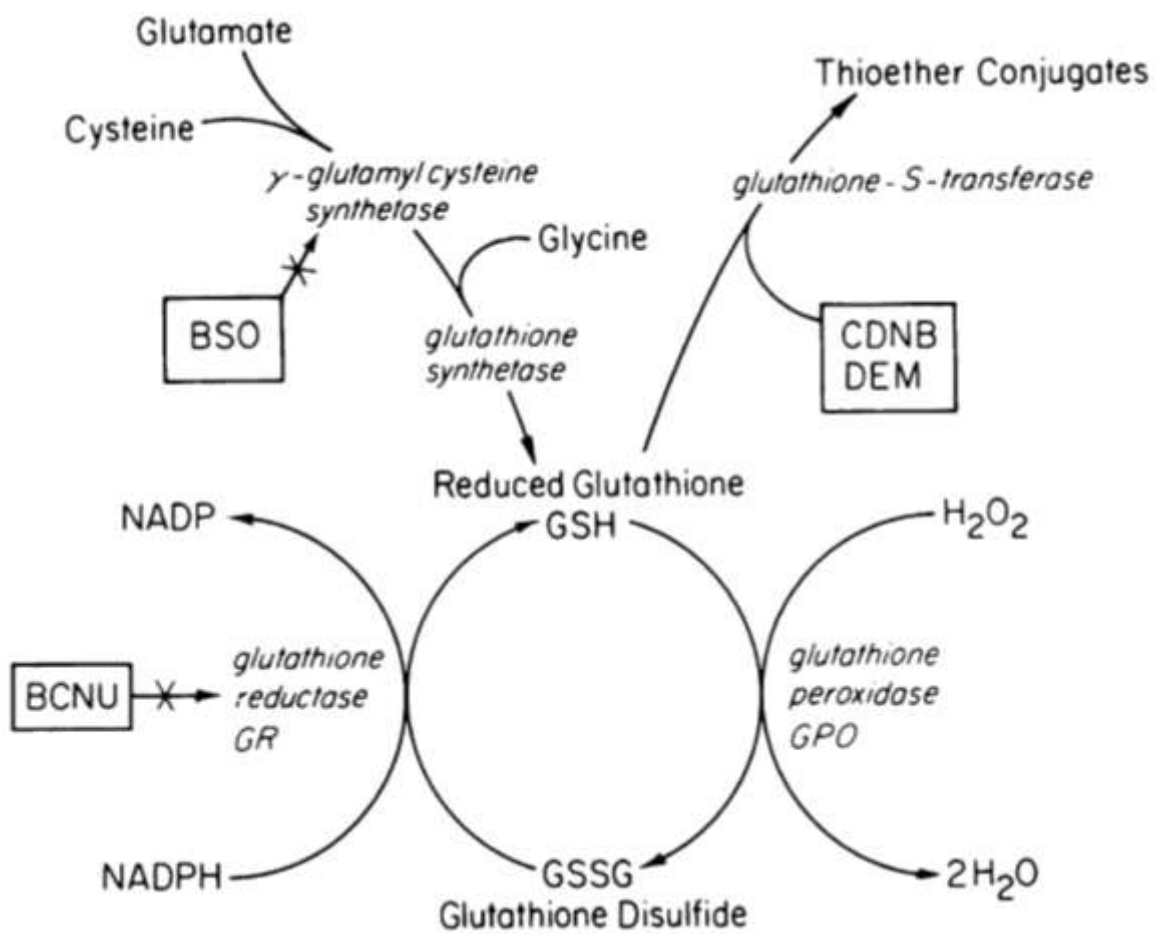
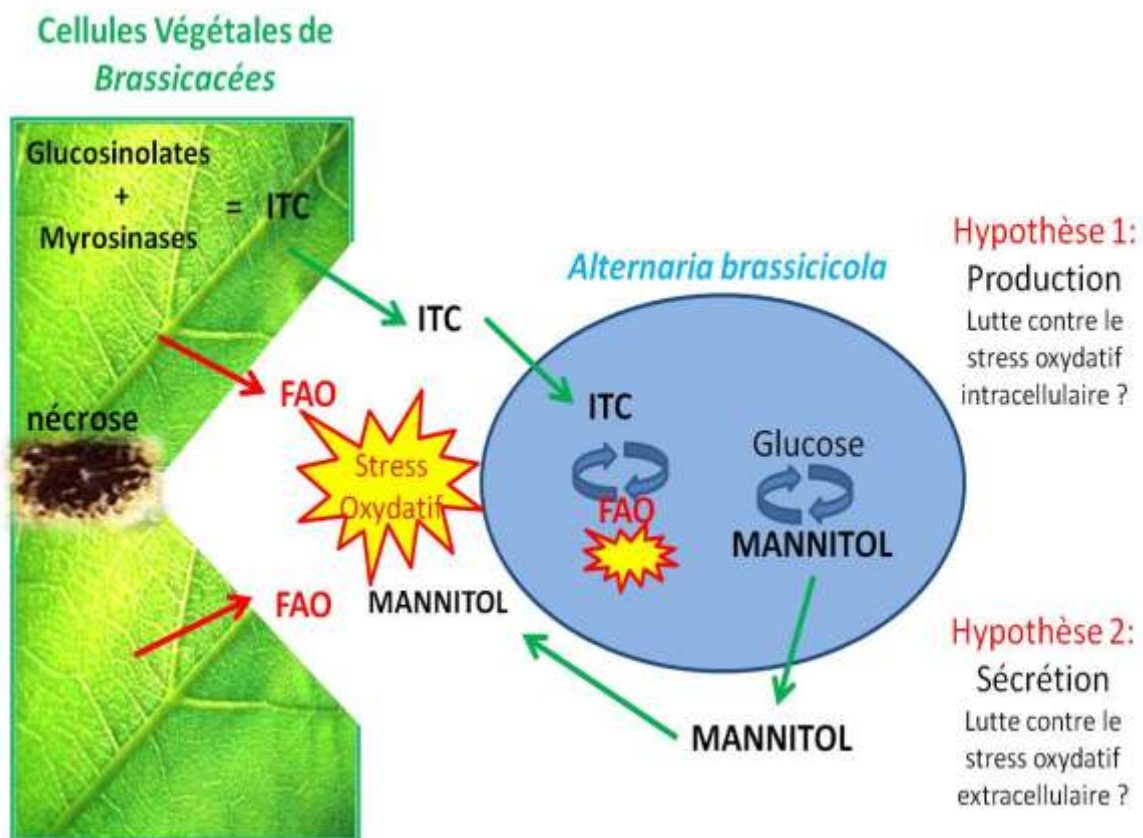


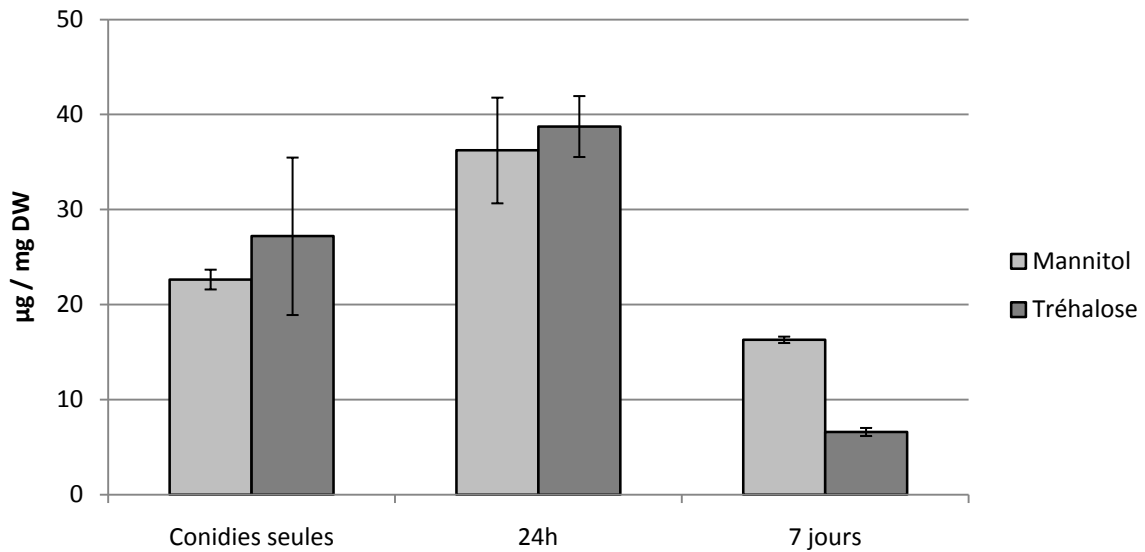
Figure 12: Métabolisme du mannitol chez les champignons filamenteux (selon Vélèz *et al.*, 2006).



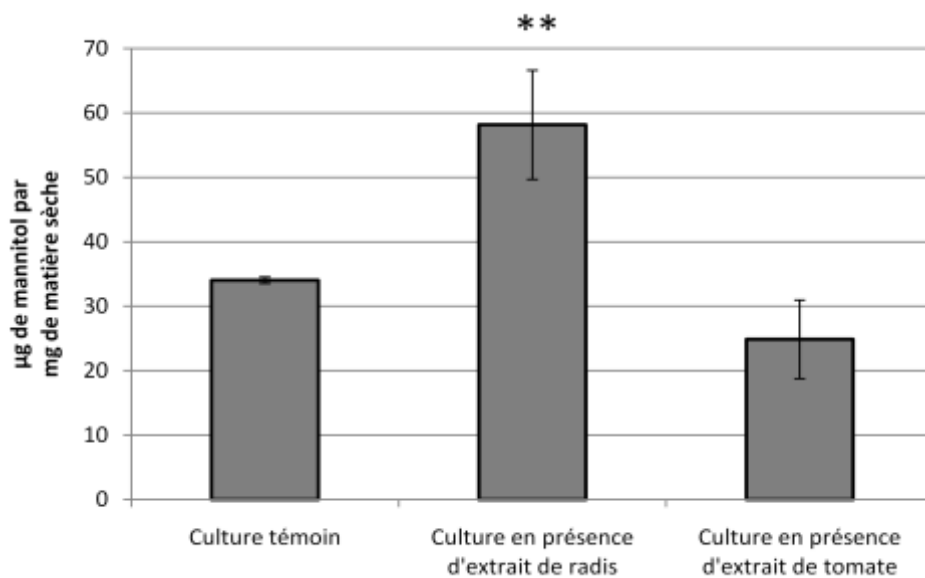
**Figure 13** : Cycle redox du glutathion (Harlan *et al.*, 1984).  $\gamma$ -GCS:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, GST: glutathion S-transferase, G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase, GR: glutathione reductase, GPx: glutathione peroxidase, BSO: buthionine sulfoximine, CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, BCNU: 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea.



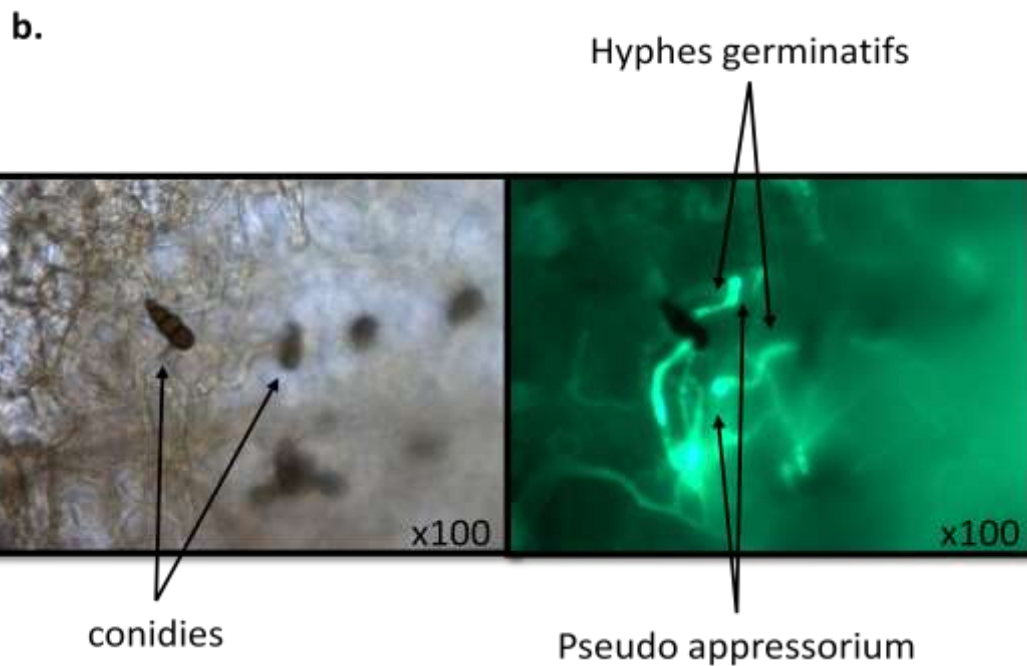
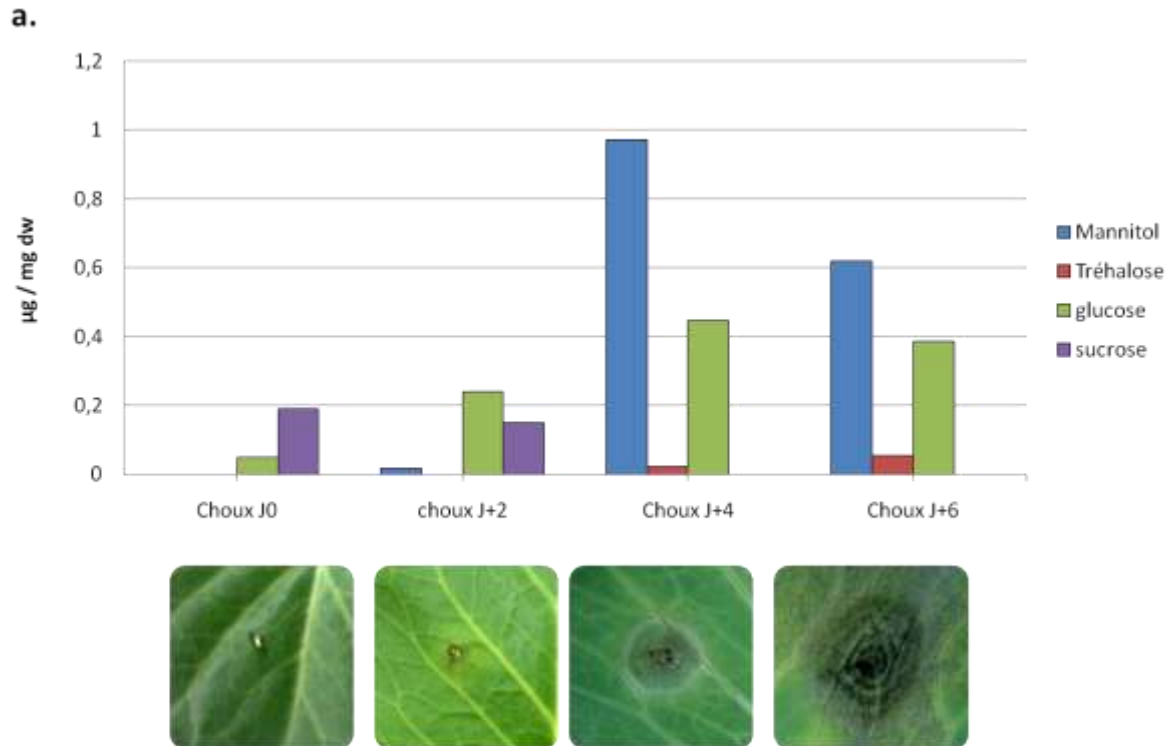
**Figure 14:** Modèle hypothétique du rôle du mannitol au cours de l'interaction Brassicacées / *A. brassicicola*



**Figure 15:** Dosage par HPLC des sucres solubles majoritaires intracellulaires, en µg par mg de matière sèche à différents stades de croissance d'*A. brassicicola* (culture Vogel + 2% glucose, 150 rpm, 24°C).

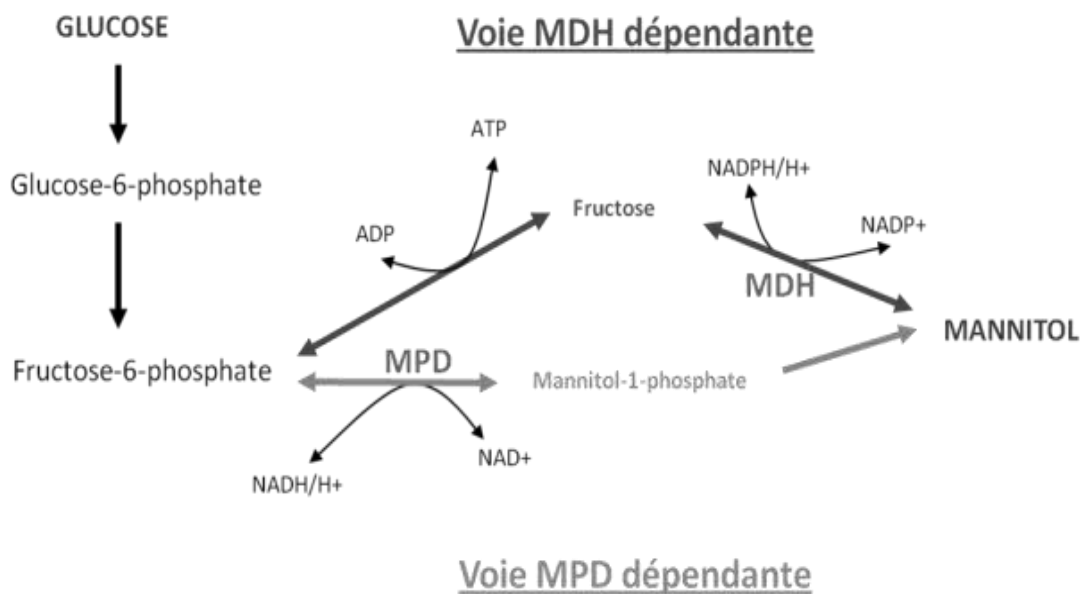


**Figure 16:** Dosage par HPLC du mannitol intracellulaire issu de mycélium du génotype sauvage Ab43wt cultivé dans un milieu PDB pendant 7 jours à 24°C, 150 rpm. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage ou au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

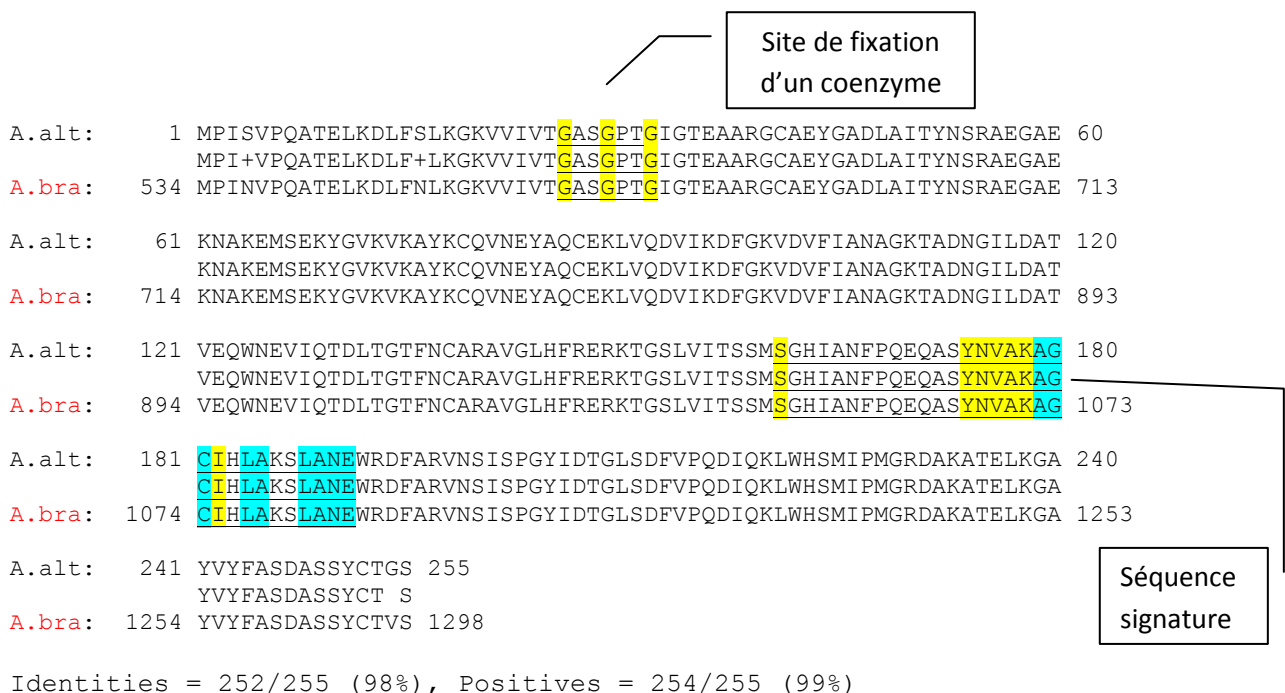


**Figure 17: (a)** Dosage par HPLC des sucres solubles majoritaires, présents au cours de l'infection de feuilles de chou par *A. brassicicola*. Les différents stades de développement des symptômes sont illustrés sous le diagramme **(b)** Photographies d'*A. brassicicola* sur feuille de chou, 2 jours après inoculation ; coloration au solophényl. Les observations microscopiques sont réalisées en lumière visible (photo de gauche) et en lumière fluorescente (photo de droite).



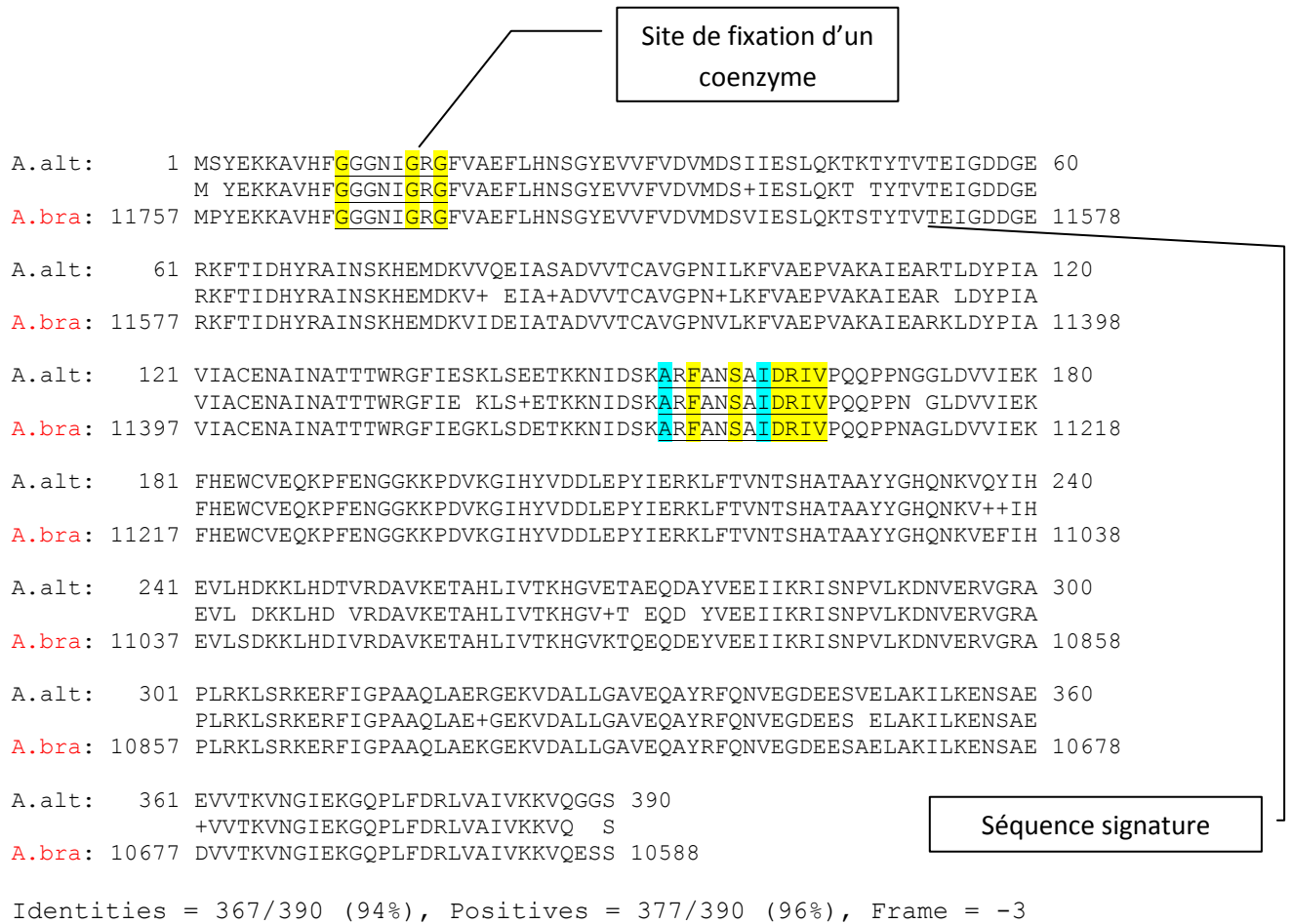


**Figure 18:** Métabolisme du mannitol chez les champignons (d'après Solomon *et al.*, 2006 ; Vélèz *et al.*, 2006).



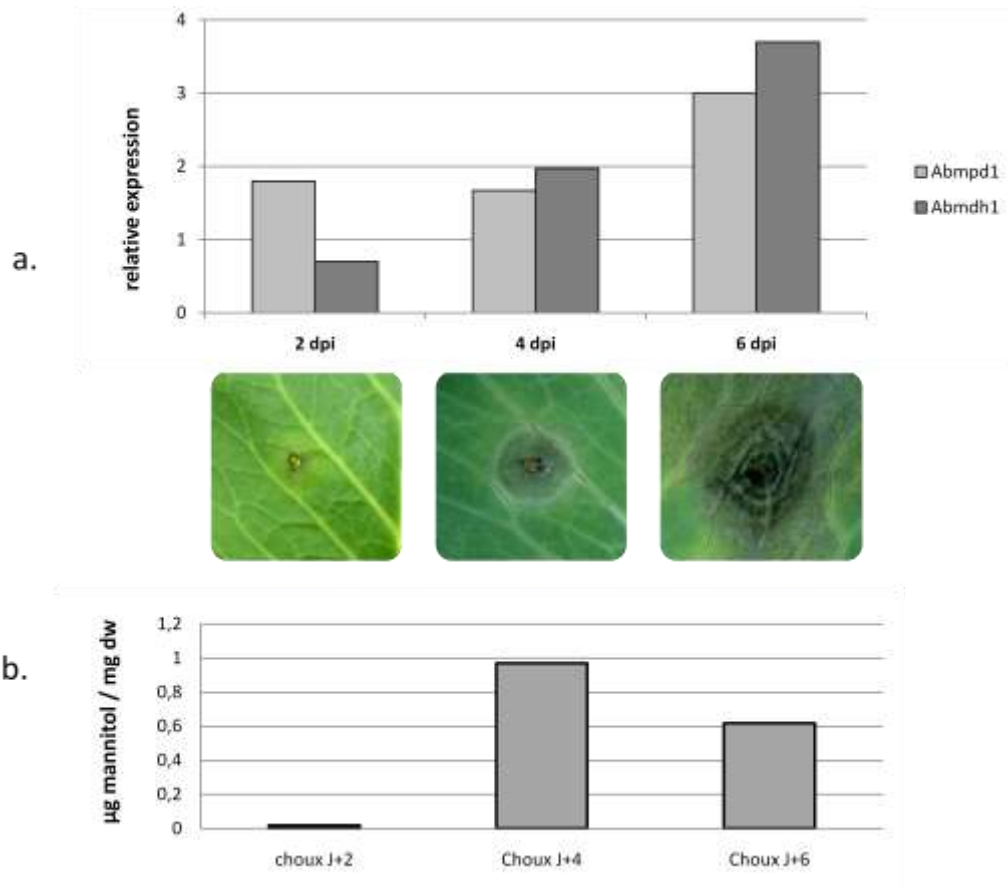
**Figure 19:** Alignement de la séquence protéique de la MDH d'*A. alternata* avec la protéine AbMDH1 d'*A. brassicicola*. En jaune les séquences consensus conservées et en bleu les séquences consensus dégénérées. GXXXGXG sont les motif consensus du site de fixation du cofacteur (Lee *et al.*, 2003) et ([LIVSPADNK]-x(12)-Y-[PSTAGNCV]-[STAGNQCIVM]-[STAGC]-K-{PC}-[SAGFYR]-[LIVMSTAGD]-x-{K}-[LIVMFYW]-x(2)-{YR}-[LIVMFYWGAPTHQ]-[GSACQRHM]) sont les séquences signature des enzymes de la famille des dehydrogenases/reductases (Hulo *et al.*, 2004).

A.alt = *A. alternata* ; A.bra = *A. brassicicola*

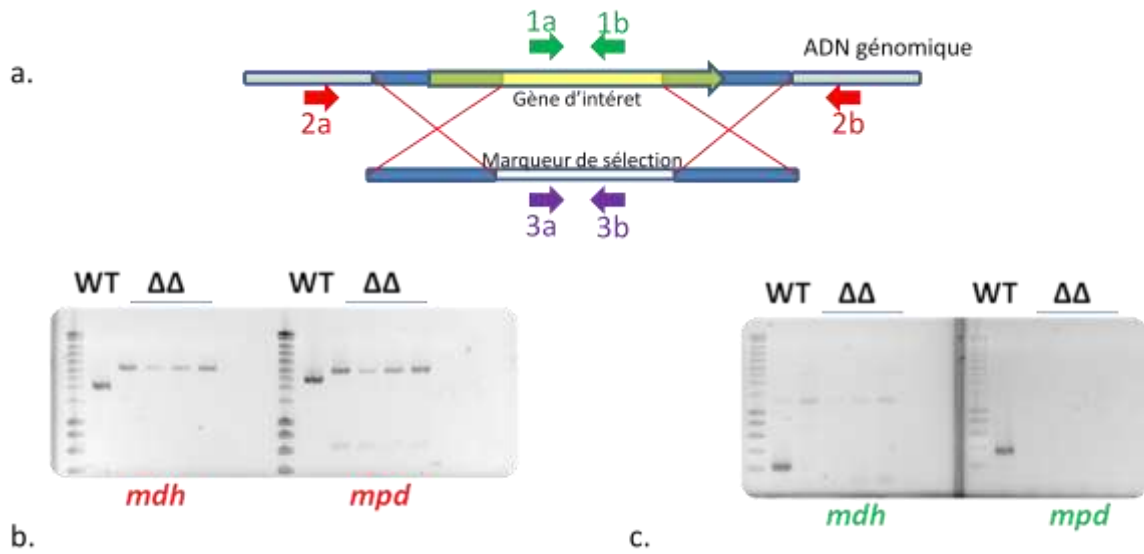


**Figure 20:** Alignement de la séquence protéique de la MPD d'*A. alternata* avec la protéine AbMPD1 d'*A. brassicicola*. En jaune les séquences consensus conservées et en bleu les séquences consensus dégénérées. GXXXGXG sont les motif consensus du site de fixation du cofacteur (Lee et al., 2003) et ([LIVSPADNK]-x(12)-Y-[PSTAGNCV]-[STAGNQCIVM]-[STAGC]-K-{PC}-[SAGFYR]-[LIVMSTAGD]-x-{K}-[LIVMFYW]-x(2)-{YR}-[LIVMFYWGAPTHQ]-[GSACQRHM]) sont les séquences signature des enzymes de la famille des dehydrogenases/reductases (Hulo et al., 2004).

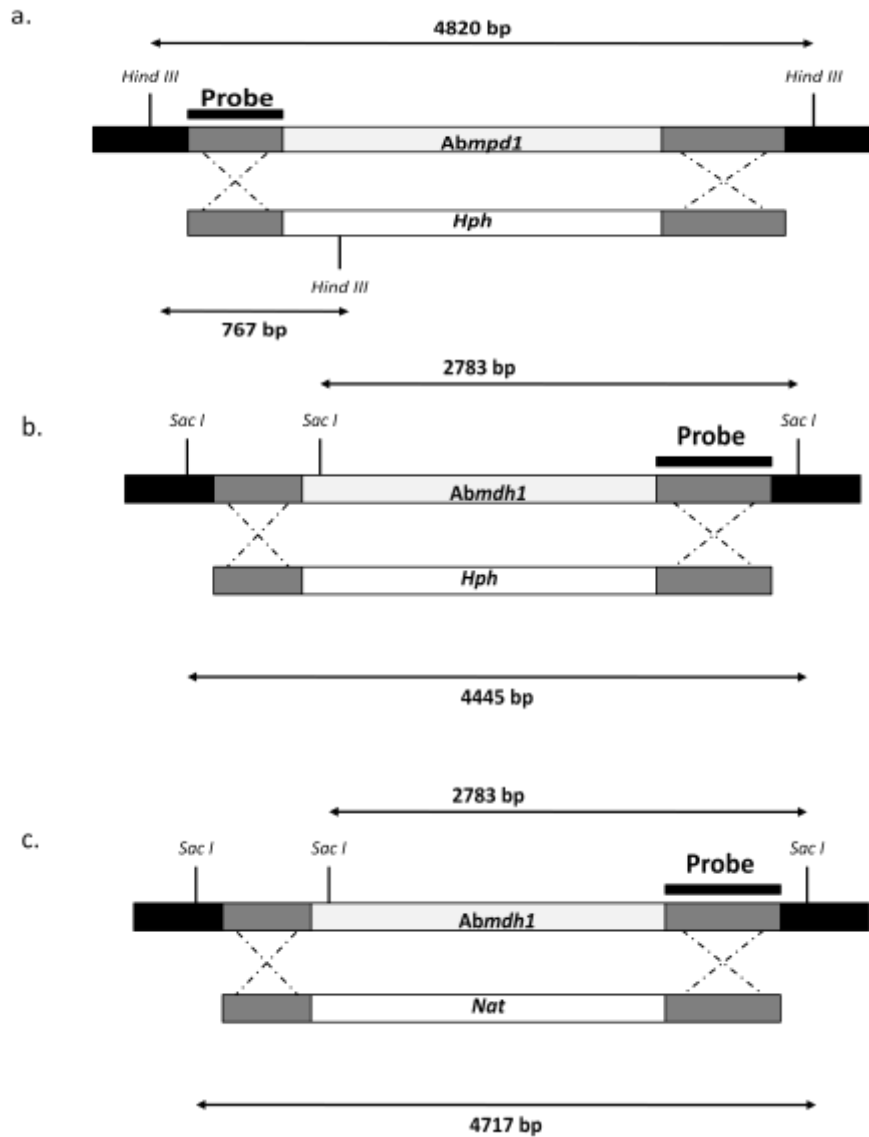
A.alt = *A. alternata* ; A.bra = *A. brassicicola*.



**Figure 21:** (a) Expression relative par RT-PCR quantitative des gènes *Abmpd1* et *Abmdh1* au cours d'une cinétique d'infection. (b) Evolution de la quantité de mannitol présent *in planta* au cours d'une cinétique d'infection.

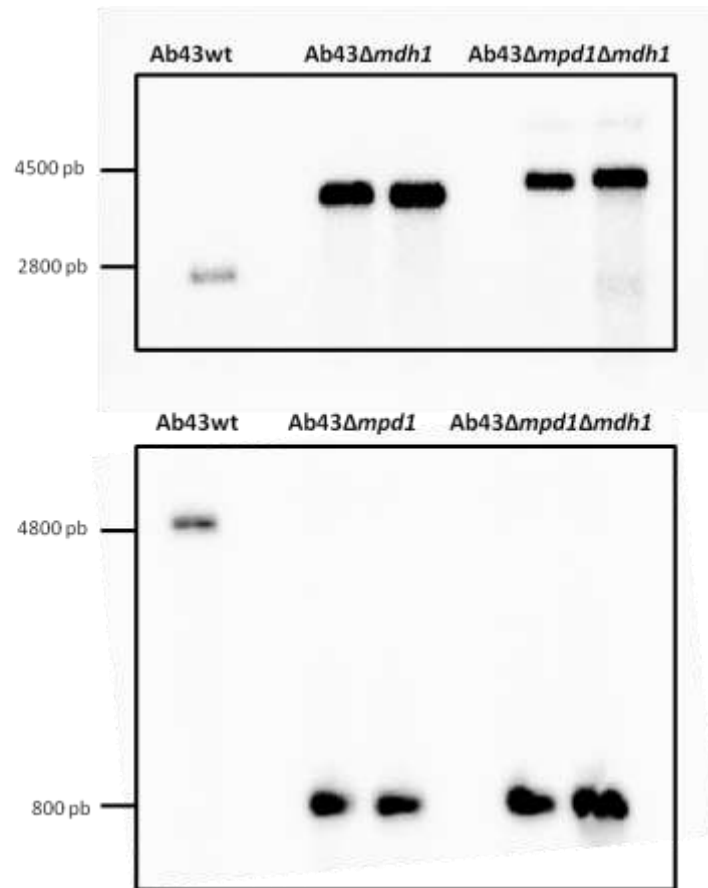


**Figure 22:** (a) Schéma de la recombinaison homologue entre l'ADN génomique d'*A. brassicicola* et la cassette de mutation. Les positions des différents couples d'amorces utilisés en PCR conventionnelle sont indiquées par des flèches. (b) Exemple de gel d'électrophorèse de produits PCR amplifiés avec des amorces de type 2a/2b pour les matrices Ab43wt (WT) et Ab $\Delta mpd1\Delta mdh1$  ( $\Delta\Delta$ ). (c) Exemple de gel d'électrophorèse de produits PCR amplifiés avec des amorces de type 1a/1b pour les matrices Ab43wt (WT) et Ab $\Delta mpd1\Delta mdh1$  ( $\Delta\Delta$ ).



**Figure 23:** Inactivation des gènes *Abmpd1* et *Abmdh1* par recombinaison homologue. Schémas de la recombinaison homologue entre le génome d'*A. brassicicola* et les cassettes de mutation incluant la position des sondes spécifiques pour les Southern-blot et les sites de restrictions. **(a)** remplacement de *Abmpd1* par le gène *Hph*, **(b)** remplacement de *Abmdh1* avec le gène *Hph*, et **(c)** remplacement de *Abmdh1* avec le gène *Nat*.

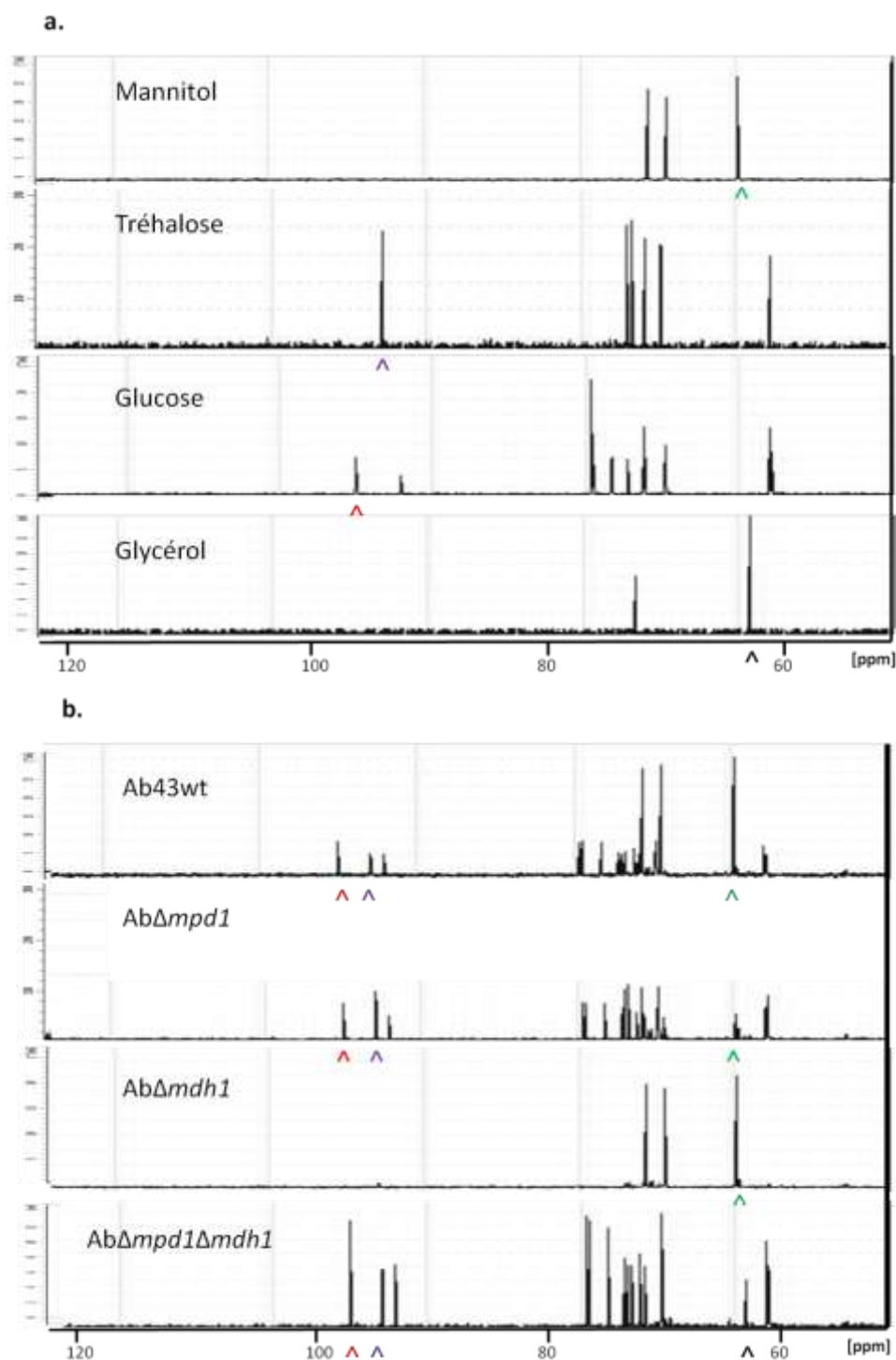
d.



**Figure 23: (d)** Résultats d'hybridation à partir d'ADN génomiques du génotype sauvage et des mutants digérés avec *Hind III* pour la vérification de la délétion du gène *Abmpd1* ou *Sac I* pour la vérification de la délétion du gène *Abmdh1*.

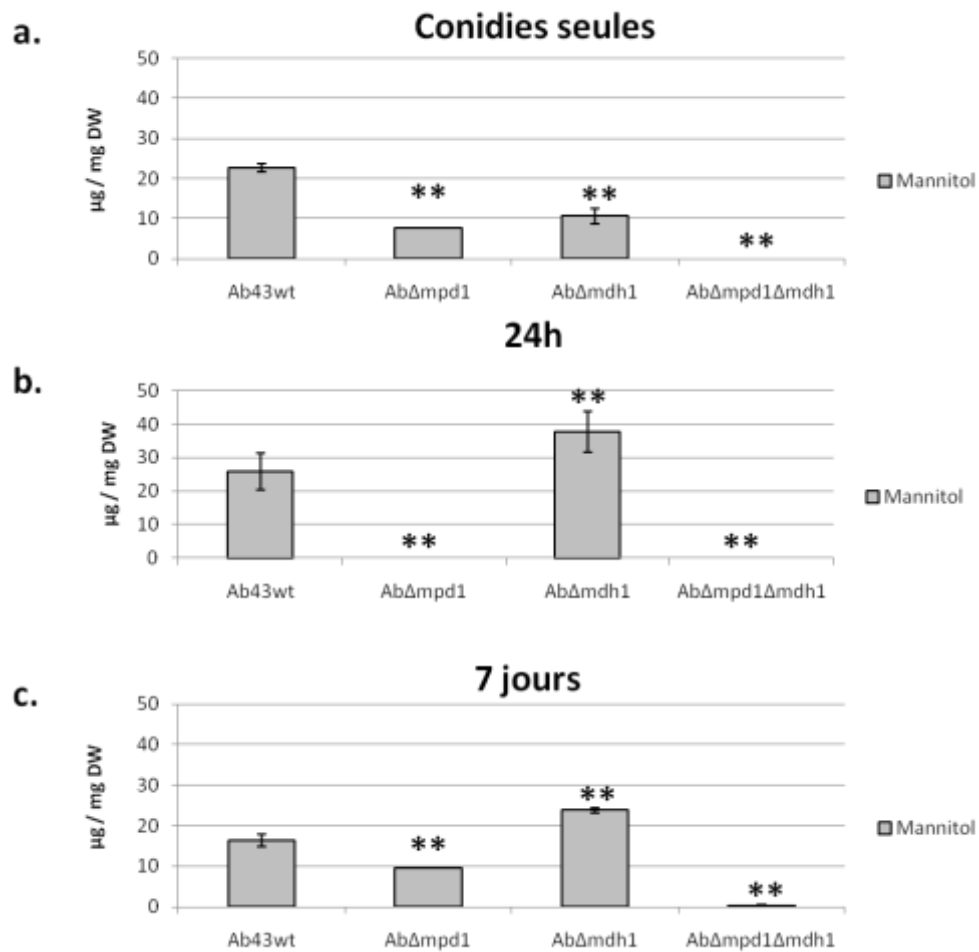
**Tableau 2 :** Activités des enzymes MPD et MDH dosées à partir d'extraits de protéines totales de mycélium d'*AbΔmpd1*, *AbΔmdh1*, *AbΔmpd1Δmdh1* et *Ab43wt* en  $\mu\text{mol}$  de NADPH consommé par minute et par mg de protéines (**u**).

<b>Souches</b>	<b>Activité MDH</b> en $\mu\text{mol}$ de NADPH / min / mg de protéines	<b>Activité MPD</b> en $\mu\text{mol}$ de NADH / min / mg de protéines
<i>Ab43wt</i>	3,7 u $\pm$ 0,16	5,1 u $\pm$ 0,85
<i>AbΔmpd1</i>	3,7 u $\pm$ 0,03	<b>0 u</b>
<i>AbΔmdh1</i>	<b>0 u</b>	5,6 u $\pm$ 0,35
<i>AbΔmpd1Δmdh1</i>	<b>0 u</b>	<b>0 u</b>

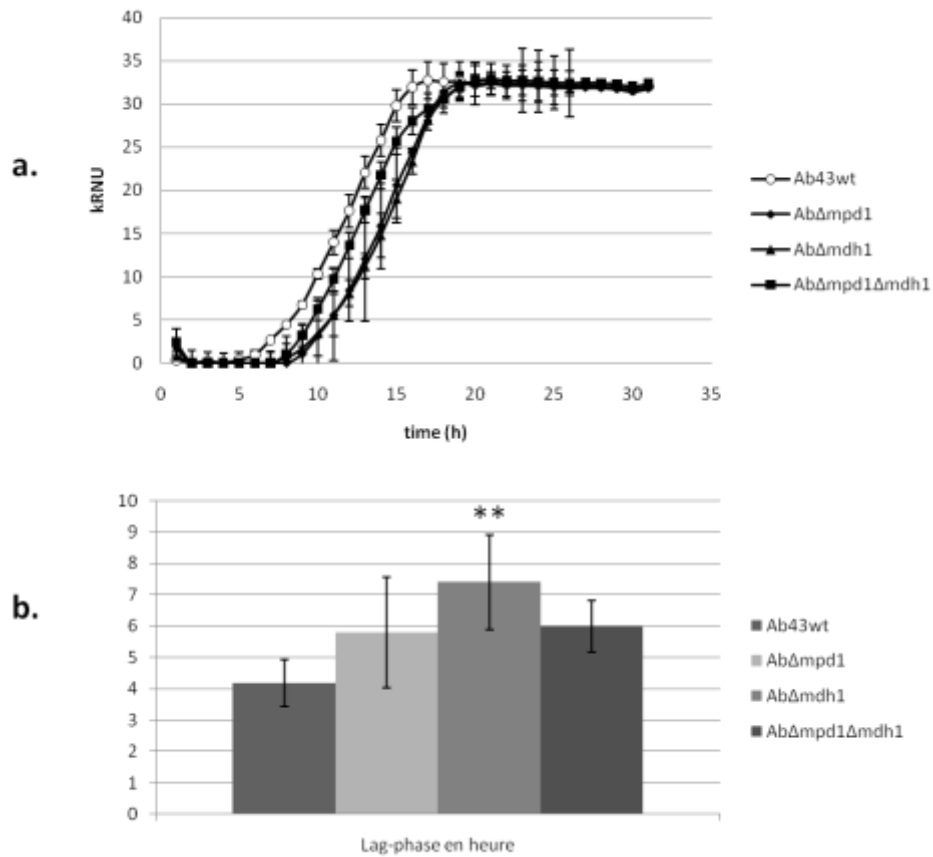


**Figure 24:** (a) Spectres RMN de différents sucres ou polyol pur. (b) Spectres RMN d'extraits de sucres solubles issus du génotype sauvage et de mutants d'*A. brassicicola* (7 jours de cultures, Vogel + 2% de glucose, 150 rpm, 24°C). Signaux spécifiques du mannitol: flèches vertes, signaux spécifiques du glucose: flèches rouges, signaux spécifiques du tréhalose: flèches violettes, signaux spécifiques du glycérol: flèches noires.

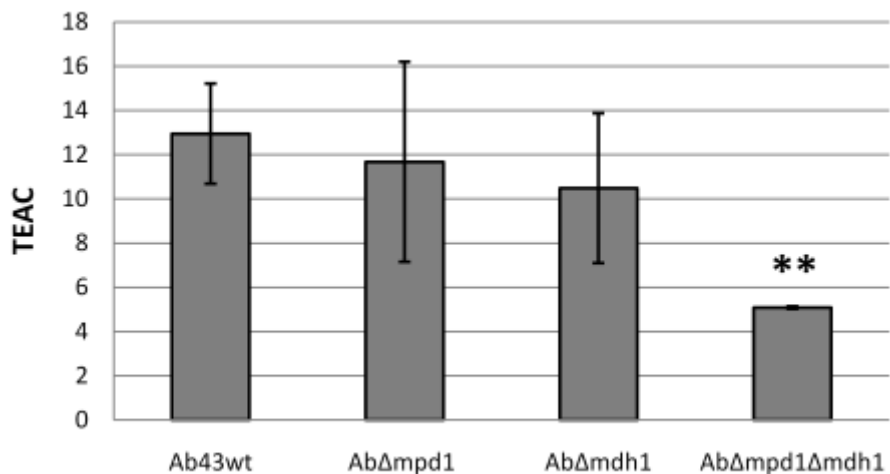




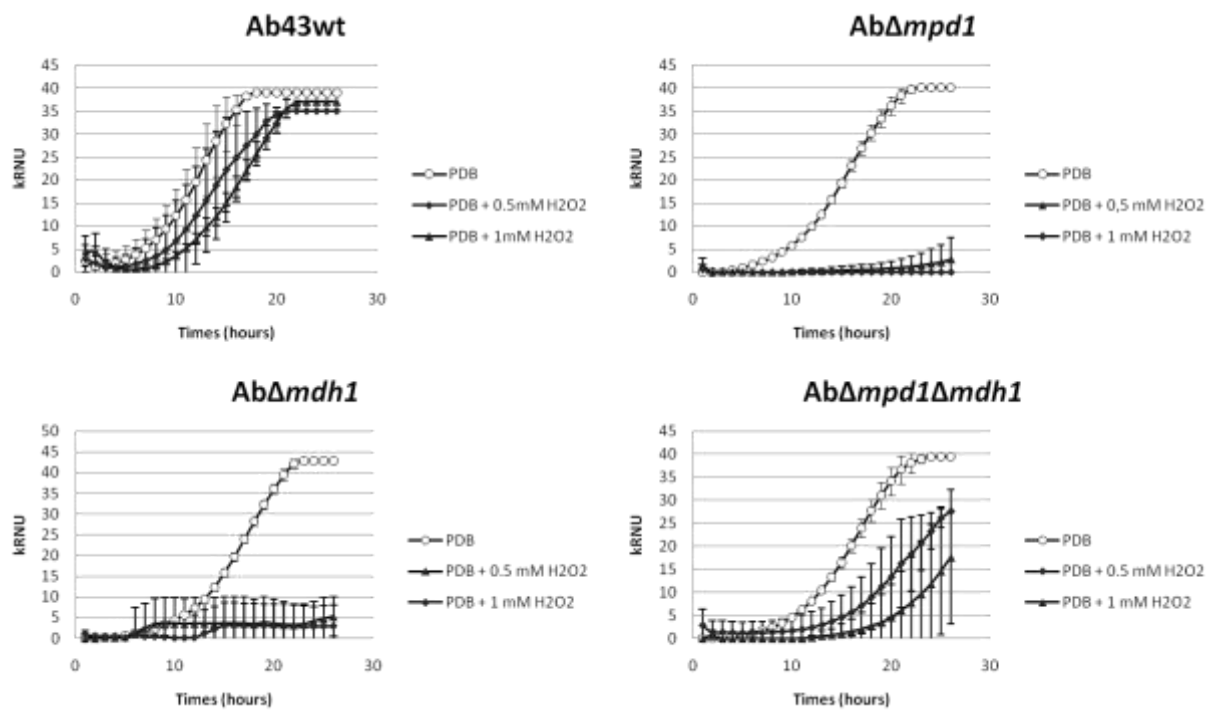
**Figure 25:** Dosages par HPLC du mannitol extrait du génotype sauvage et des mutants d'*A. brassicicola* issus soit des conidies seules (**a**) soit d'une culture de 24h (**b**) soit d'une culture de 7 jours (**c**). (Données statistiquement différentes du génotype sauvage ou au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



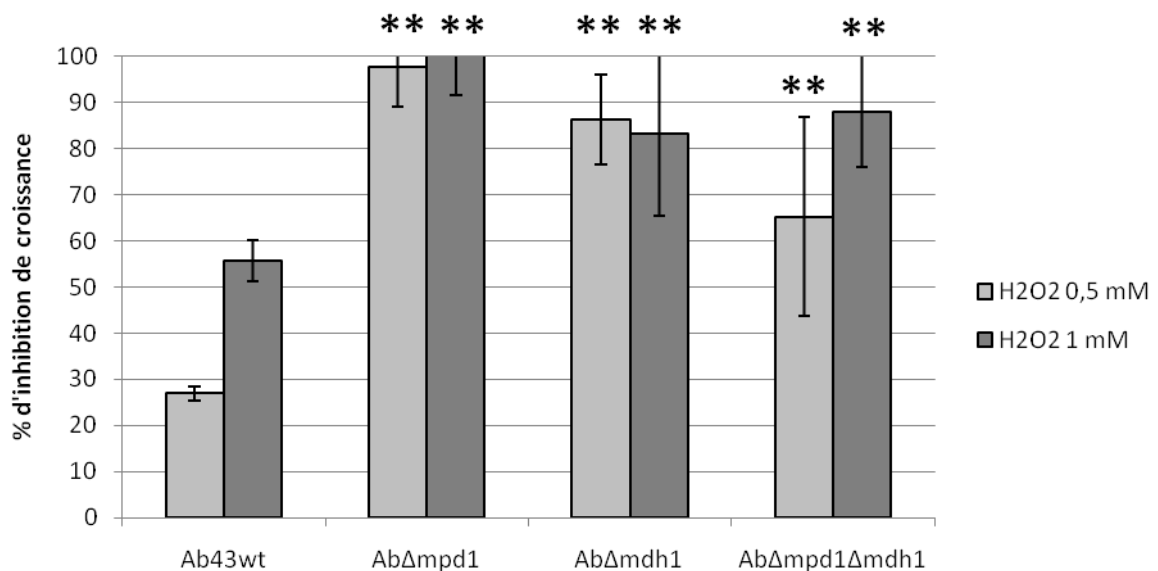
**Figure 26:** (a) Cinétique de croissance par néphélométrie du génotype sauvage et des mutants du métabolisme du mannitol. (b) Lag-time pour chaque génotype. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



**Figure 27:** Potentiel anti-oxydant d'extraits de sucres solubles de différents génotypes d'*A.brassicola* en TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity), issus d'un test DPPH, solvant méthanol). (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

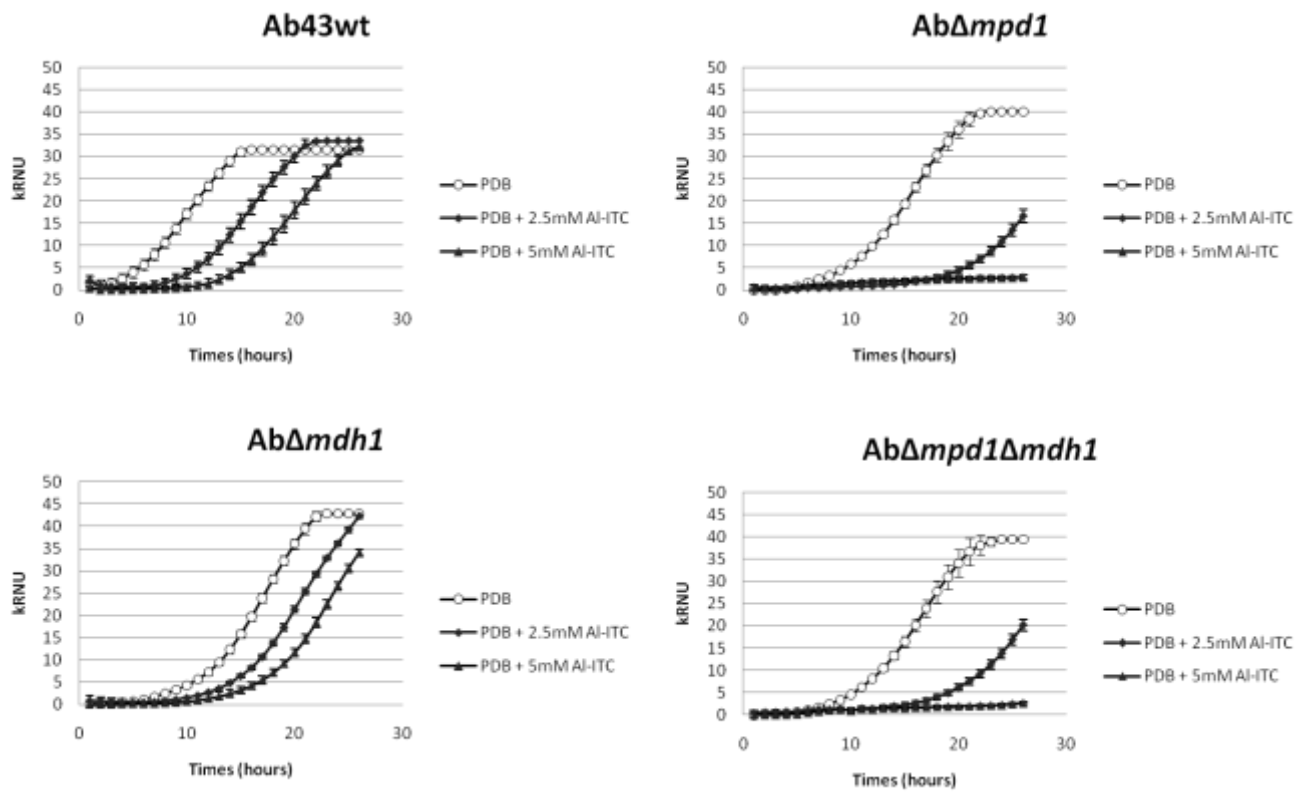


**Figure 28:** Evaluation de la sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol par rapport au génotype sauvage face à un stress oxydatif généré par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **(a)** Représentation graphique de cinétiques de croissance obtenues par néphélométrie.

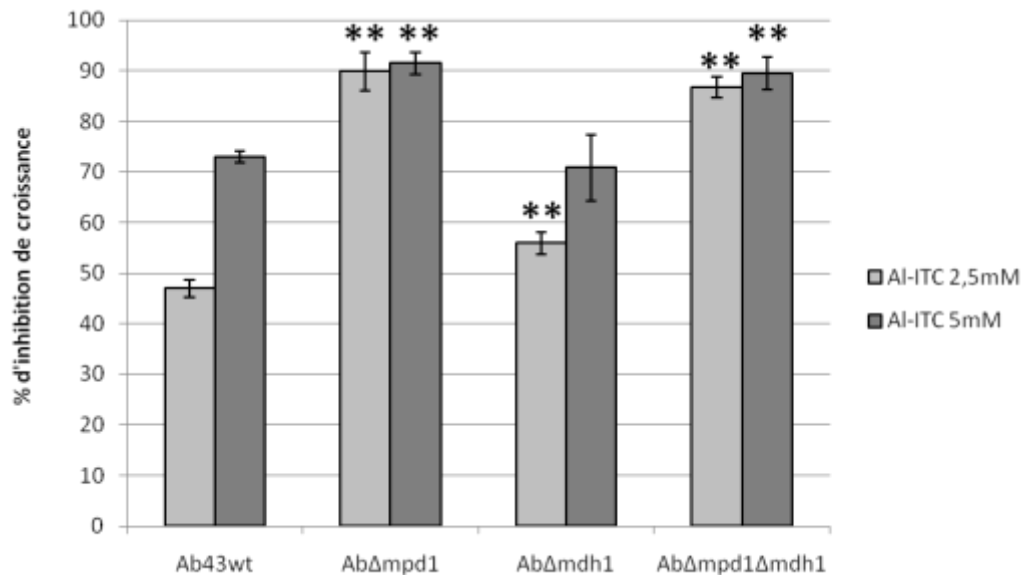


**Figure 28: (b)** Pourcentages d'inhibition de croissance calculés à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

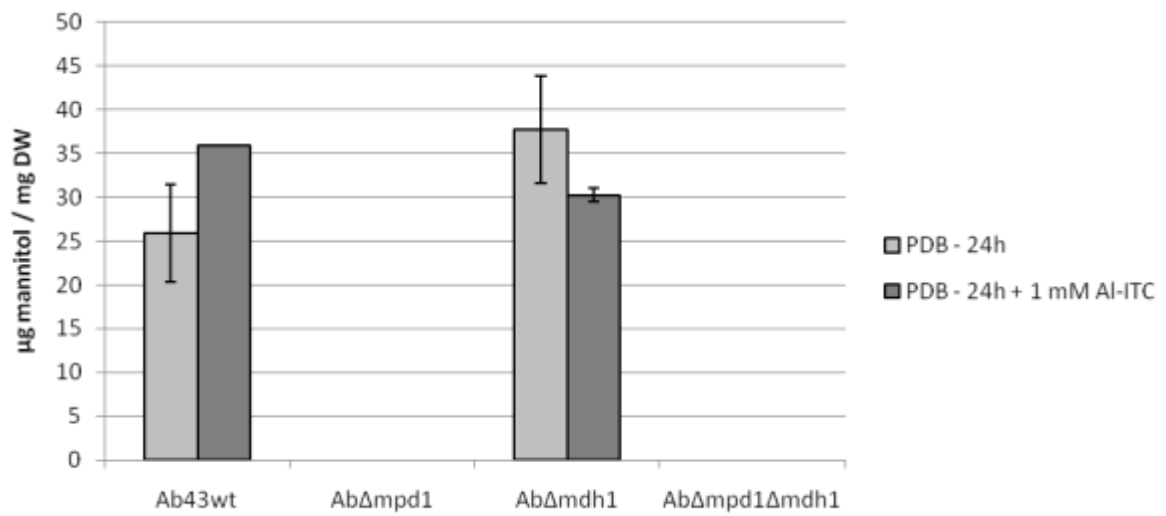
a.



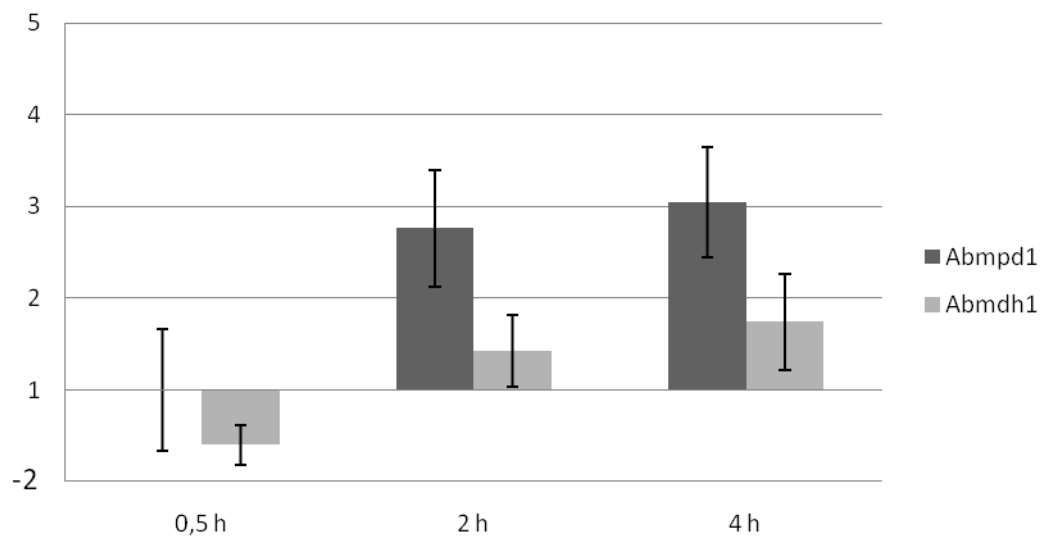
b.



**Figure 29:** Evaluation de la sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol par rapport au génotype sauvage face à un stress oxydatif généré par les Ayl-isothiocyanates. **(a)** Représentation graphique de cinétiques de croissance par néphélométrie. **(b)** Pourcentages d'inhibition de croissance calculés à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

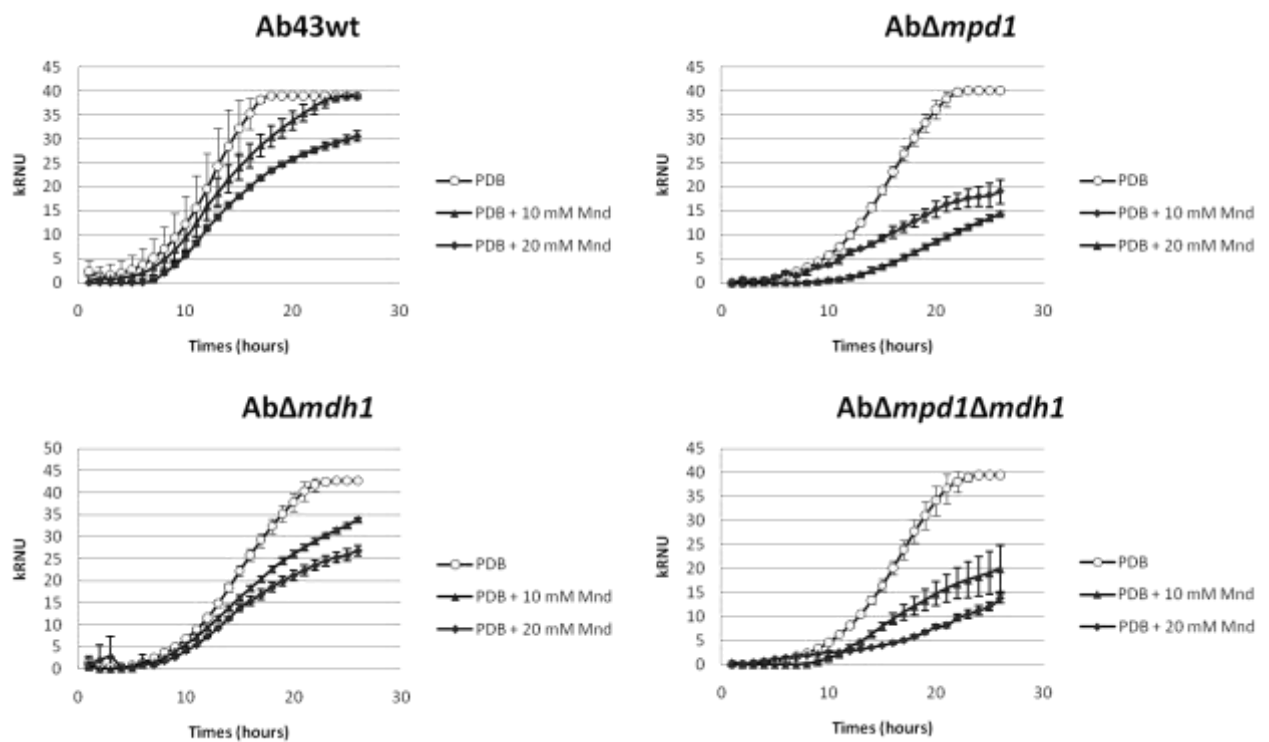


**Figure 30:** Evolution du mannitol intracellulaire en réponse à un stress oxydatif généré par 1 mM d'Allyl-ITC. (\*) Donnée significativement différente entre la condition traitée avec 1 mM d'Al-ITC et non-traitée.

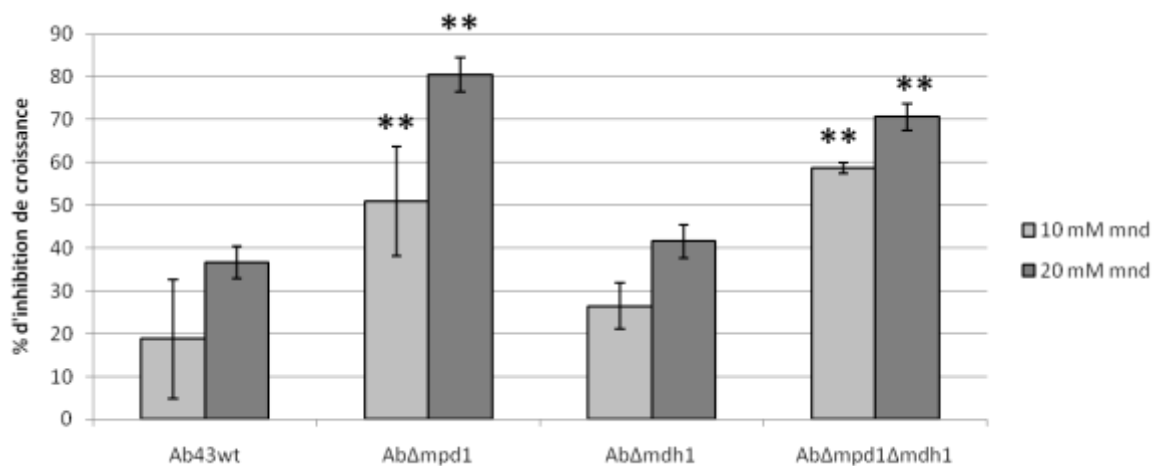


**Figure 31:** Expression relative des gènes *Abmpd1* et *Abmdh1* mesuré par RT-qPCR au cours d'une cinétique d'exposition aux AI-ITC (1mM).

a.

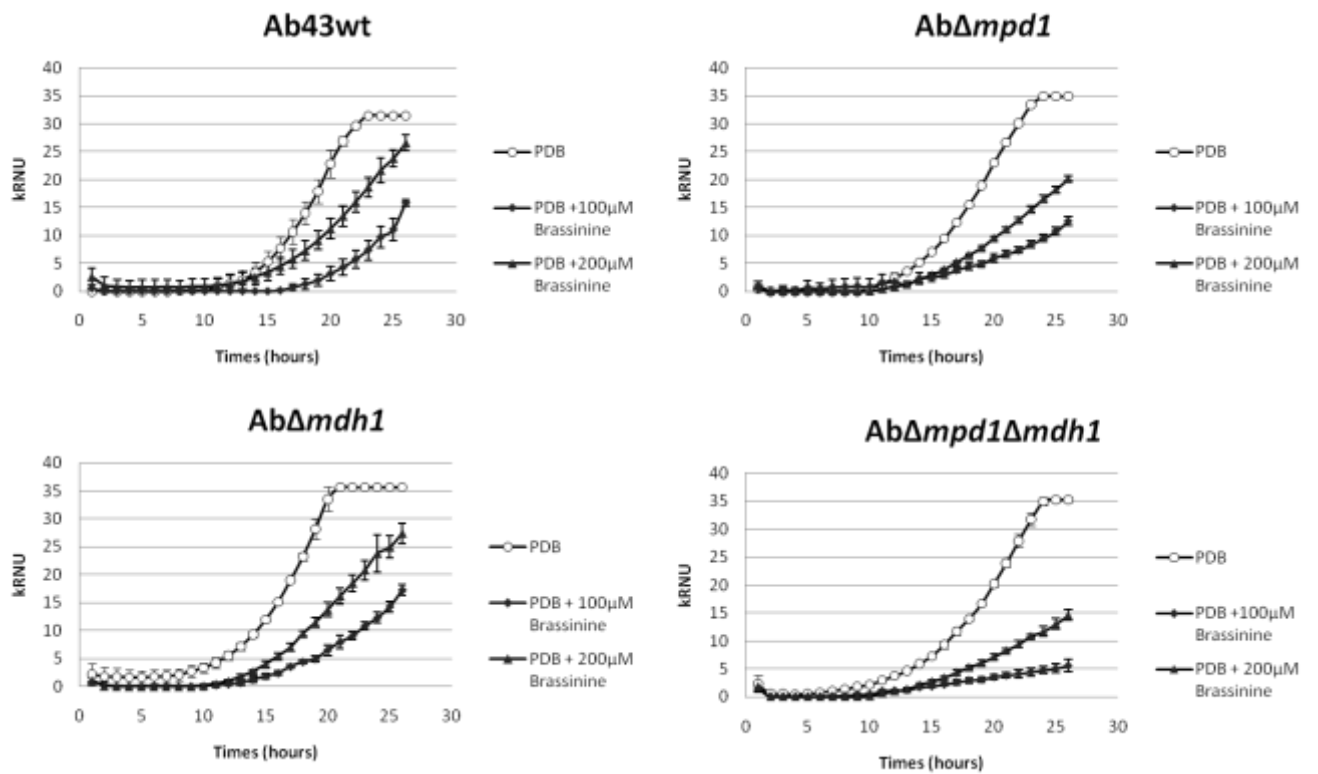


b.

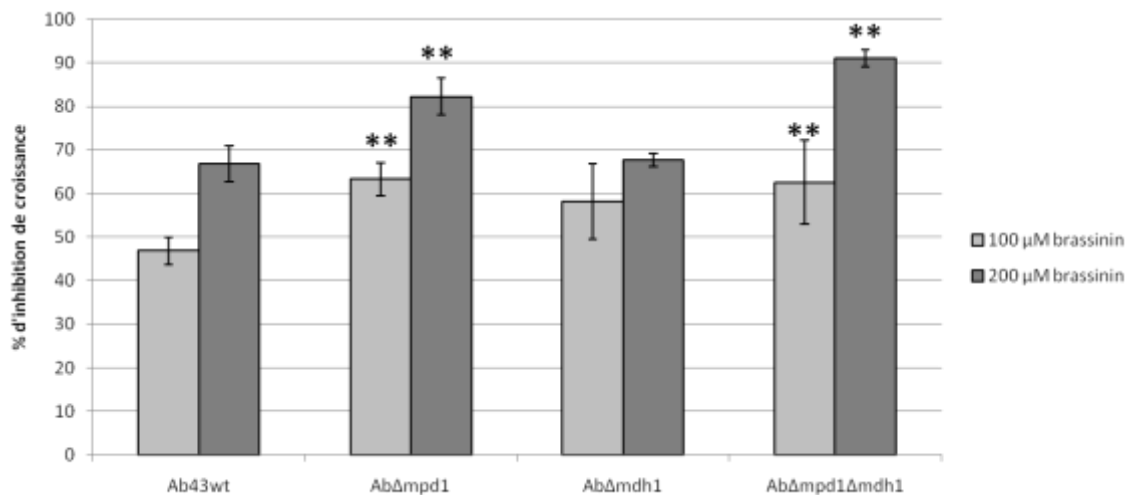


**Figure 32:** Evaluation de la sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol par rapport au génotype témoin face à un stress oxydatif généré par la ménadione. **(a)** Représentation graphique d'une cinétique de croissance par néphélométrie. **(b)** Pourcentages d'inhibition de croissance calculé à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

a.

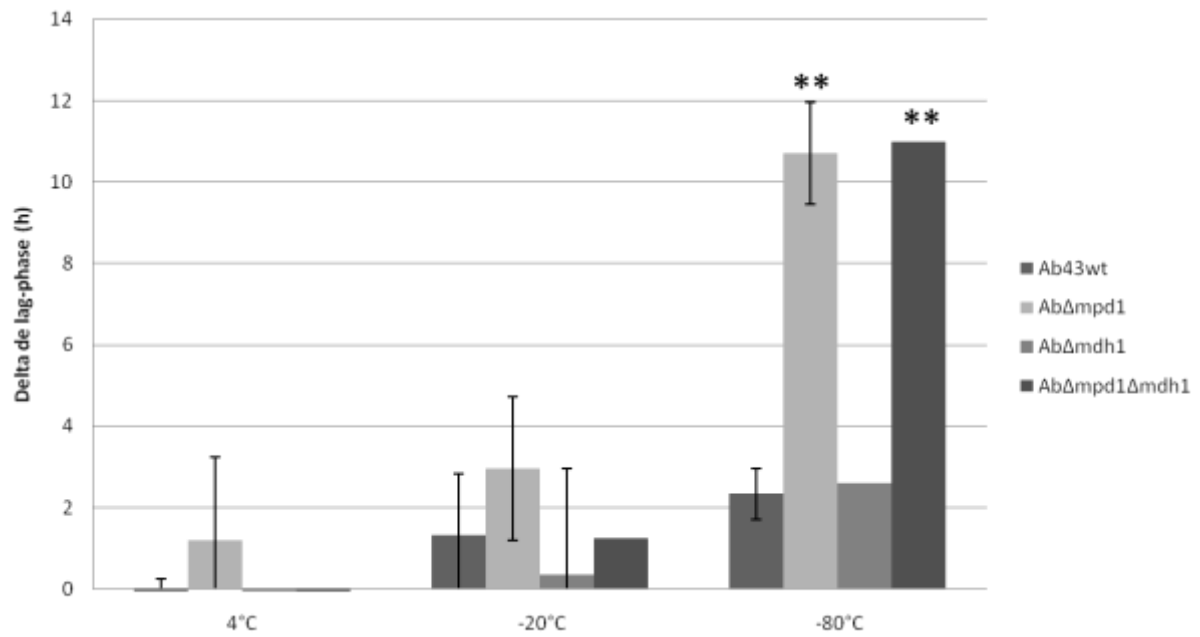


b.



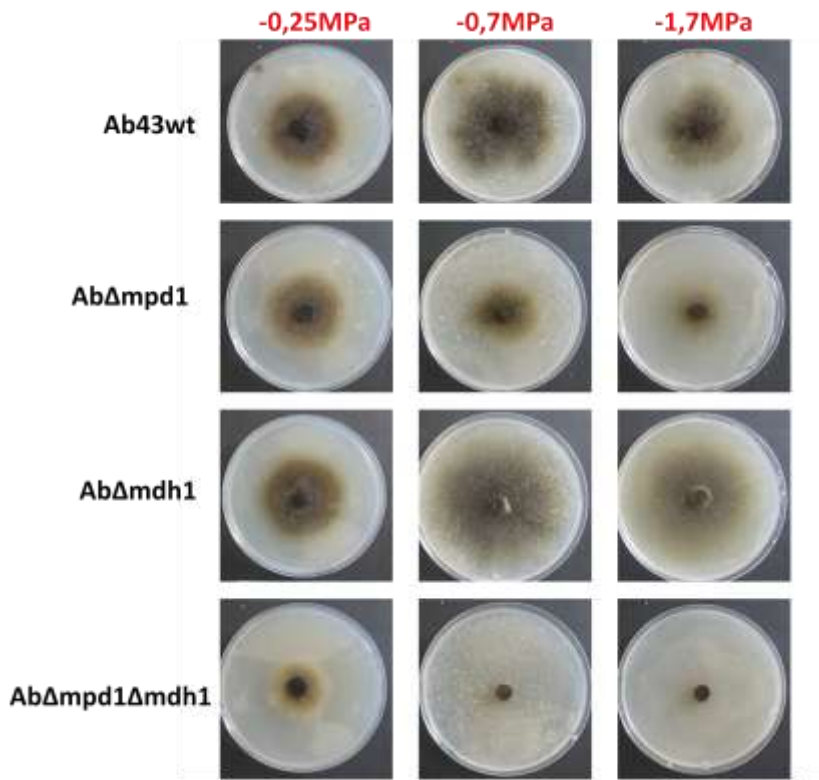
**Figure 33:** Evaluation de la sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol par rapport au génotype sauvage face à la phytoalexine brassinine. **(a)** Représentation graphique de cinétiques de croissance par néphélométrie. **(b)** Pourcentages d'inhibition de croissance calculés à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



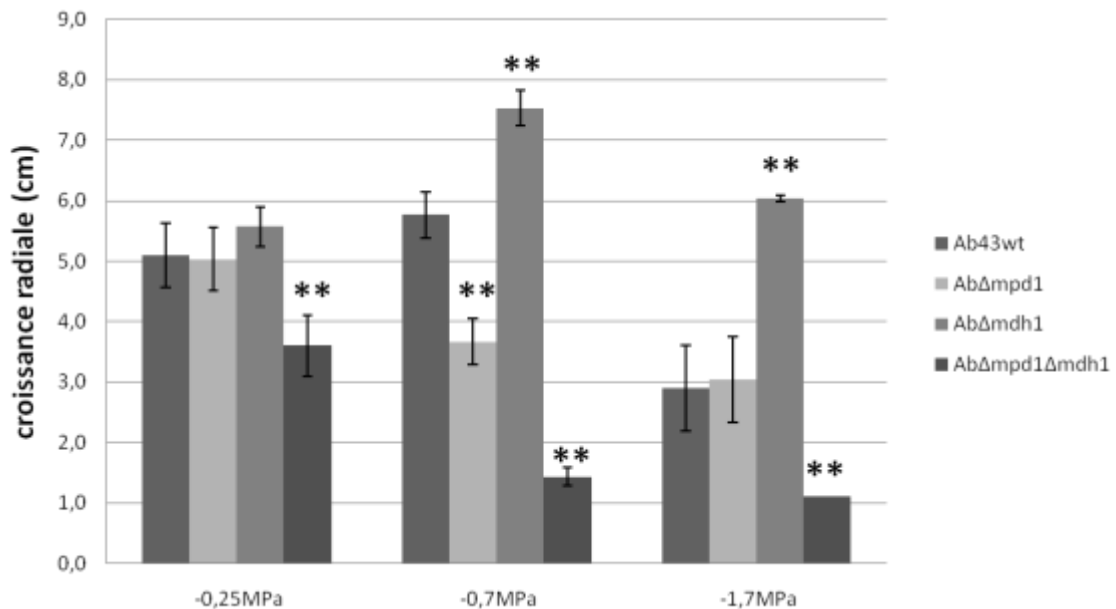


**Figure 34:** Evaluation de la viabilité des conidies après un stress thermique de 24h par différences de lag-time ( $\Delta$  de lag-time) par rapport à la condition non traitée. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

a.

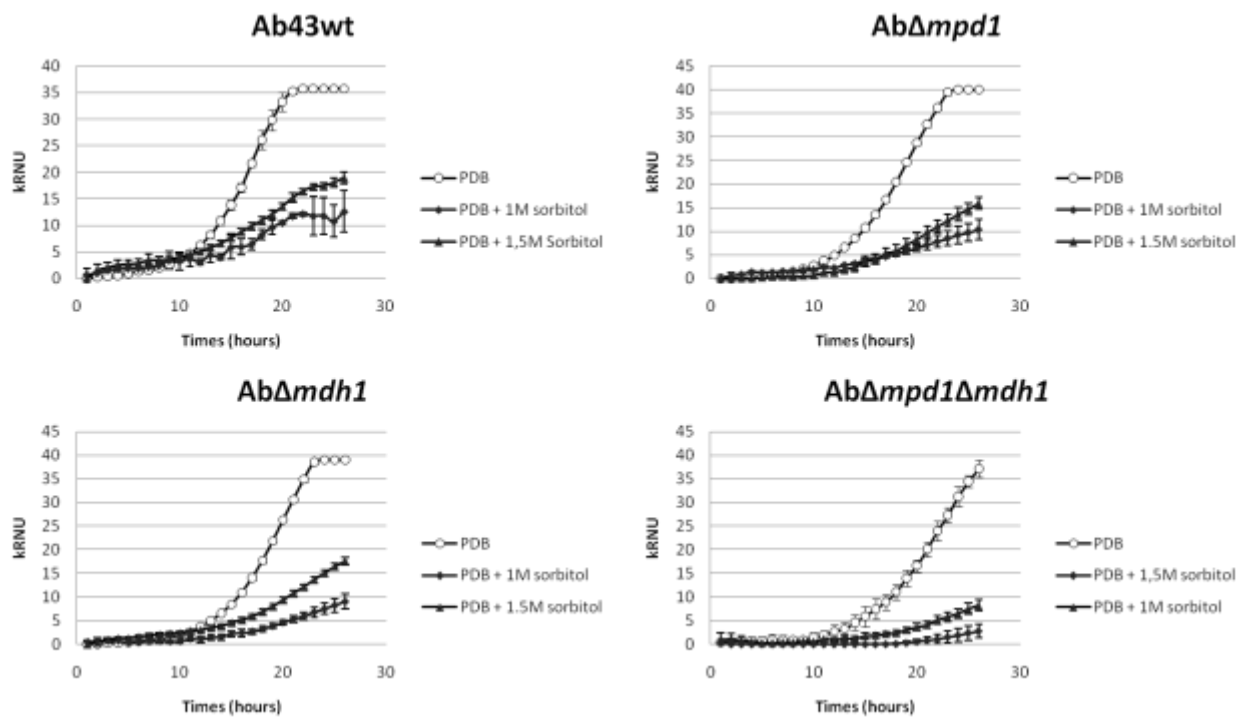


b.

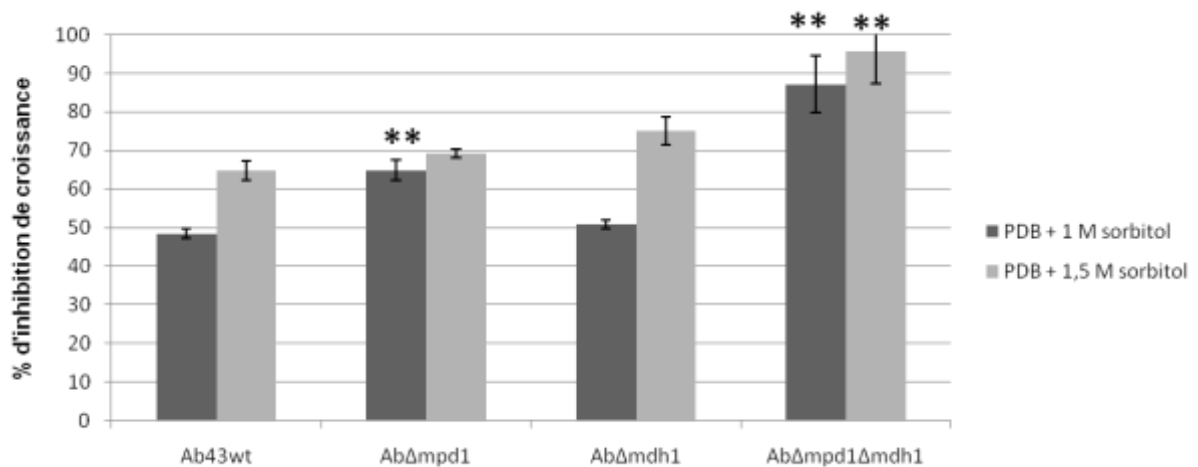


**Figure 35:** Evaluation de la tolérance à un stress matriciel après 20 jours d'incubation à 24°C sur milieu Vogel supplémenté en PEG. **(a)** Photographies représentatives des cultures solides dans les différentes conditions pour chaque géotype. **(b)** Mesure de la croissance radiale (cm) de chaque géotype pour chacune des conditions de cultures. (Données statistiquement différentes du géotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

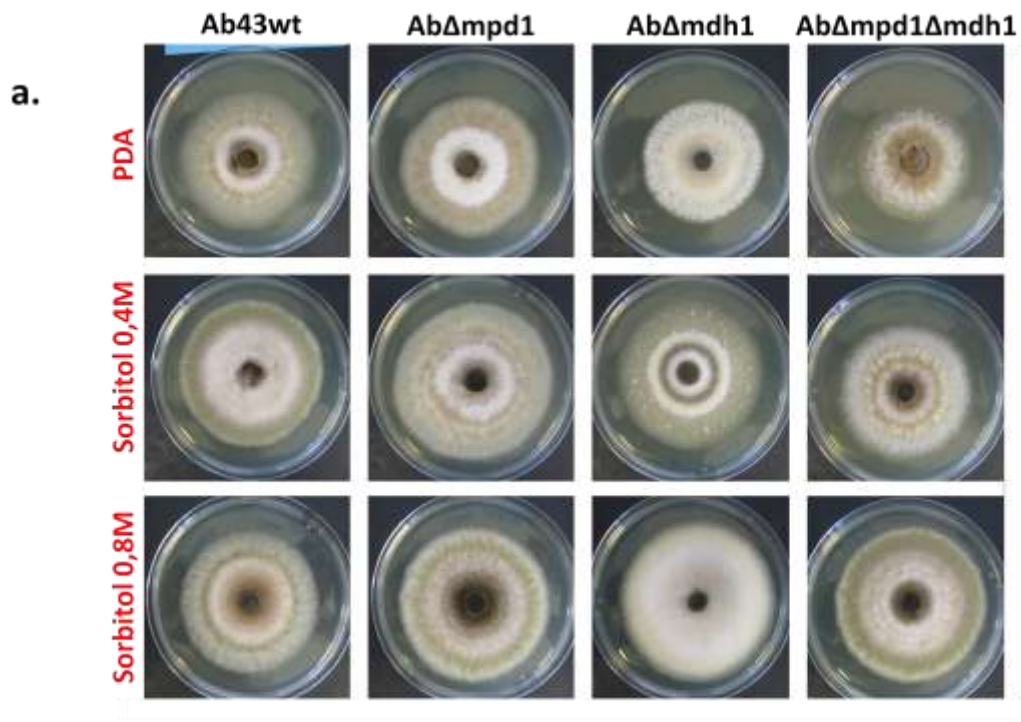
a.



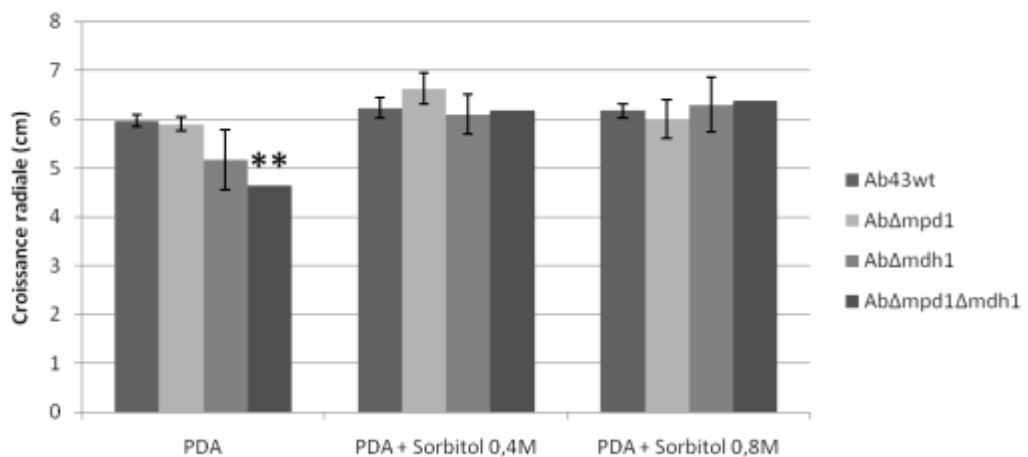
b.



**Figure 36:** Evaluation de la sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol par rapport au génotype sauvage face à un stress osmotique généré par ajout de sorbitol. **(a)** Représentations graphiques de cinétiques de croissance par néphélométrie. **(b)** Pourcentages d'inhibition de croissance calculés à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

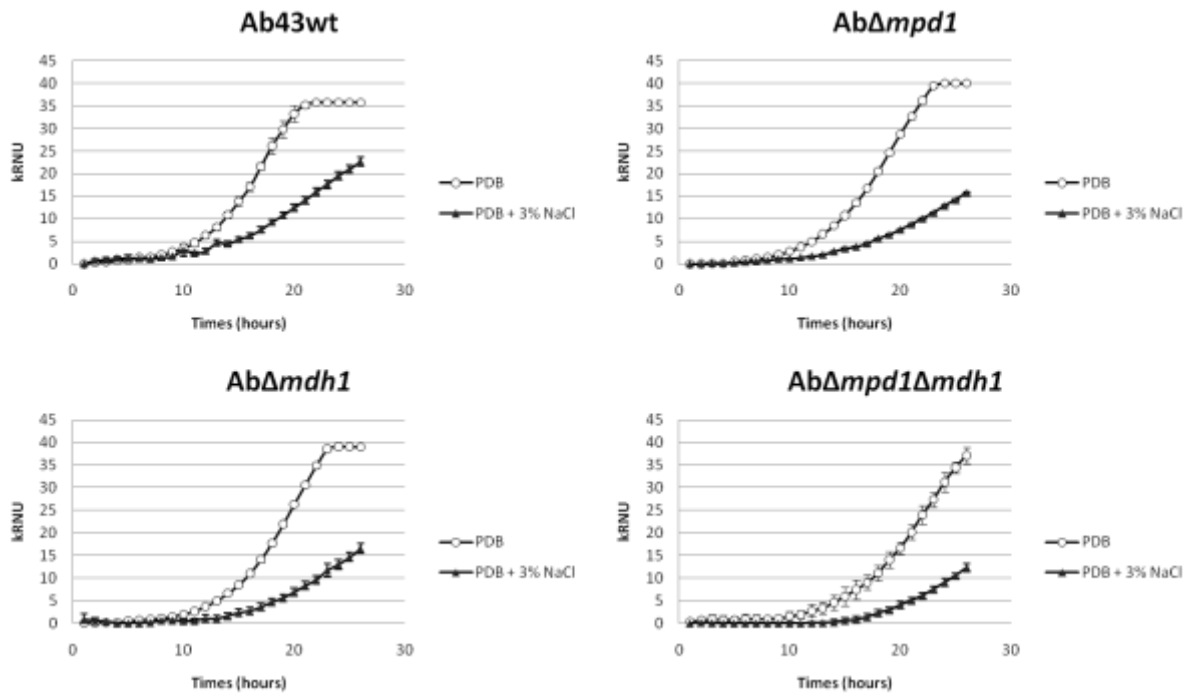


**b.**

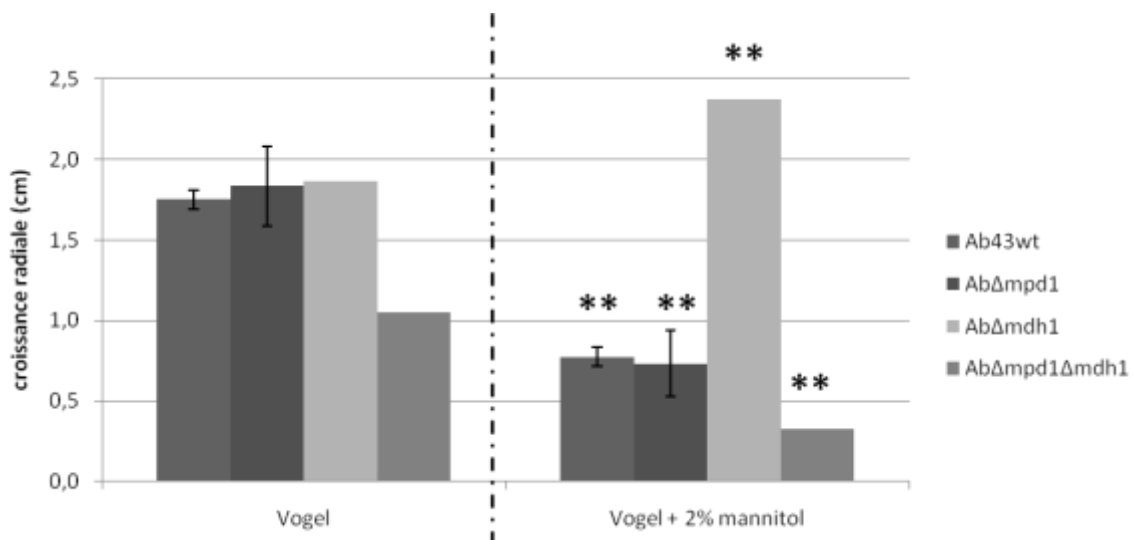


**Figure 37:** Evaluation de la tolérance à un stress osmotique après 7 jours d'incubation à 24°C sur milieu PDA supplémenté ou non en sorbitol. **(a)** Photographies représentatives des cultures solides dans les différentes conditions pour chaque génotype. **(b)** Mesure du diamètre après sept jours de croissance (cm) de chaque génotype pour chacune des conditions de cultures. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

a.



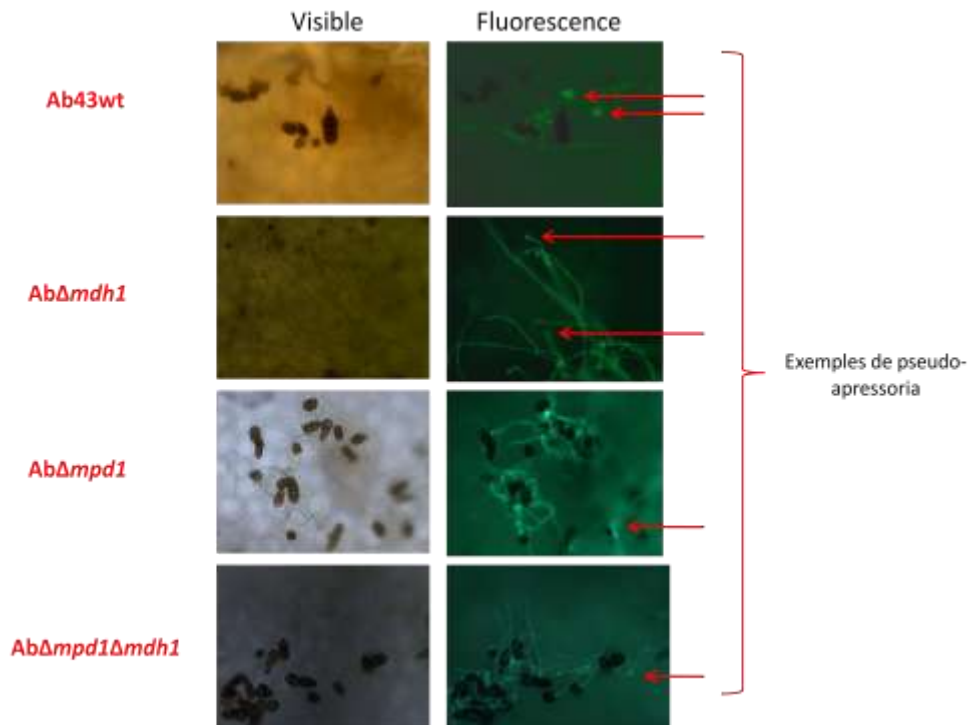
**Figure 38:** Evaluation de la sensibilité des mutants du métabolisme du mannitol par rapport au génotype sauvage face à un stress généré par ajout de NaCl. **(a)** Représentations graphiques de cinétiques de croissance par néphélométrie.



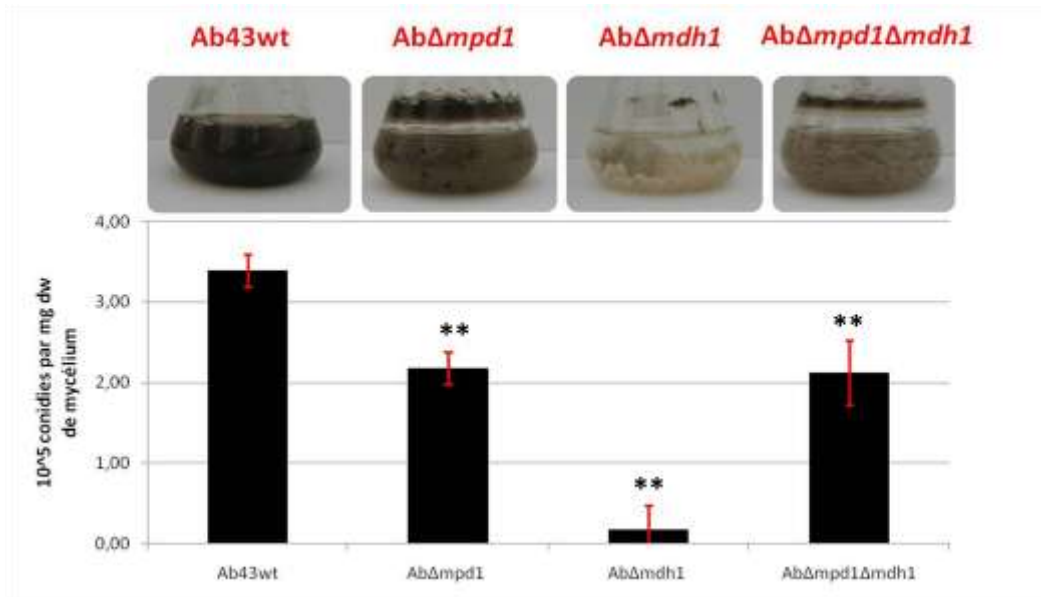
**Figure 39:** Mesure de la croissance radiale (cm) de chaque génotype après 14 jours d'incubation sur des milieux Vogel supplémenté ou non avec 2% de mannitol. (Données statistiquement différentes de la condition Vogel seul au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



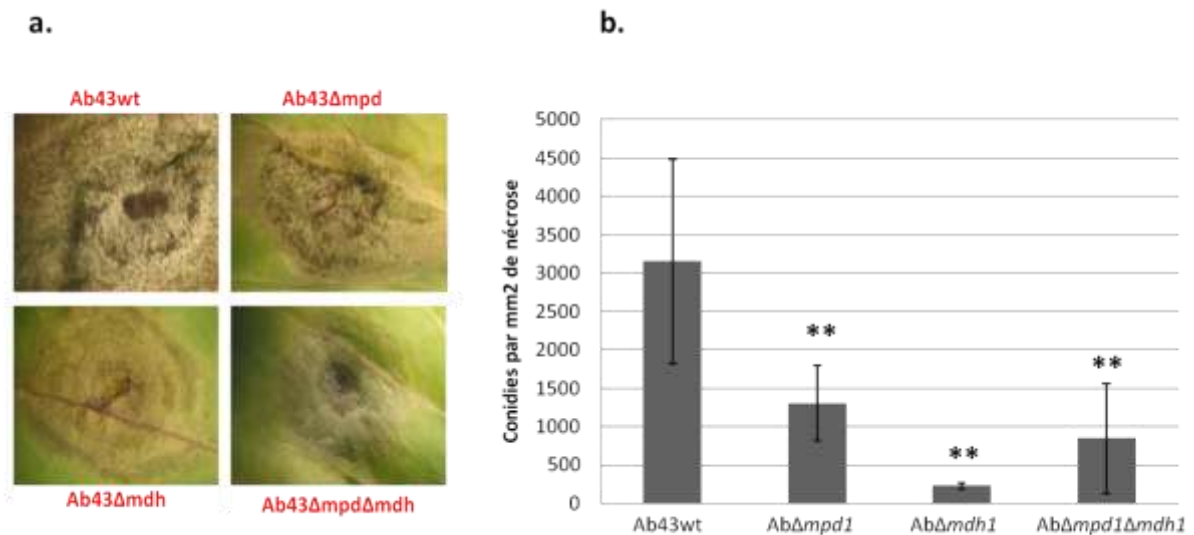
**Figure 40:** Expression du pouvoir pathogène sur chou de différents génotypes d'*A. brassicicola* inoculés à différentes concentrations en conidies (6 jours après inoculation) et pourcentage d'agressivité des mutants par rapport au génotype sauvage (taille de la nécrose mesurée pour le mutant divisée par la taille de nécrose mesurée pour le génotype sauvage, multipliée par 100). (\*) Significativement différent de 100% (agressivité totale d'Ab43wt).



**Figure 41:** Visualisation des structures d'infection développées par les différents génotypes d'*A. brassicicola* sur feuille de chou un jour après inoculation avec  $10^4$  c/ml. Coloration au solophényl et observation microscopique (grossissement x100) en lumière blanche (photographies de gauche) et fluorescente (photographies de droite).

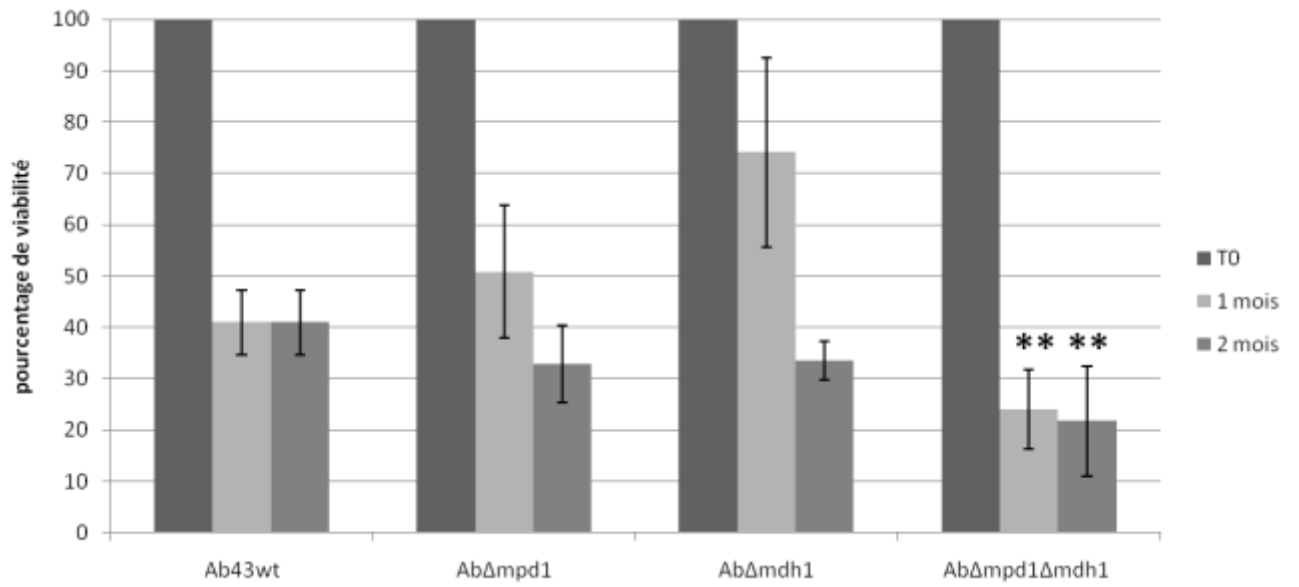


**Figure 42 :** Photographies des milieux de cultures de différents génotypes d'*A. brassicicola* après 7 jours d'incubation à 24°C dans du milieu Vogel + 2% de glucose et quantification de la sporulation *in vitro* par rapport au poids sec de mycélium. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



**Figure 43: (a)** Photographie (x40) des symptômes provoqués par différents génotypes d'*A. brassicicola* sur chou, 6 jours après inoculation et **(b)** quantification de la sporulation *in planta*. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

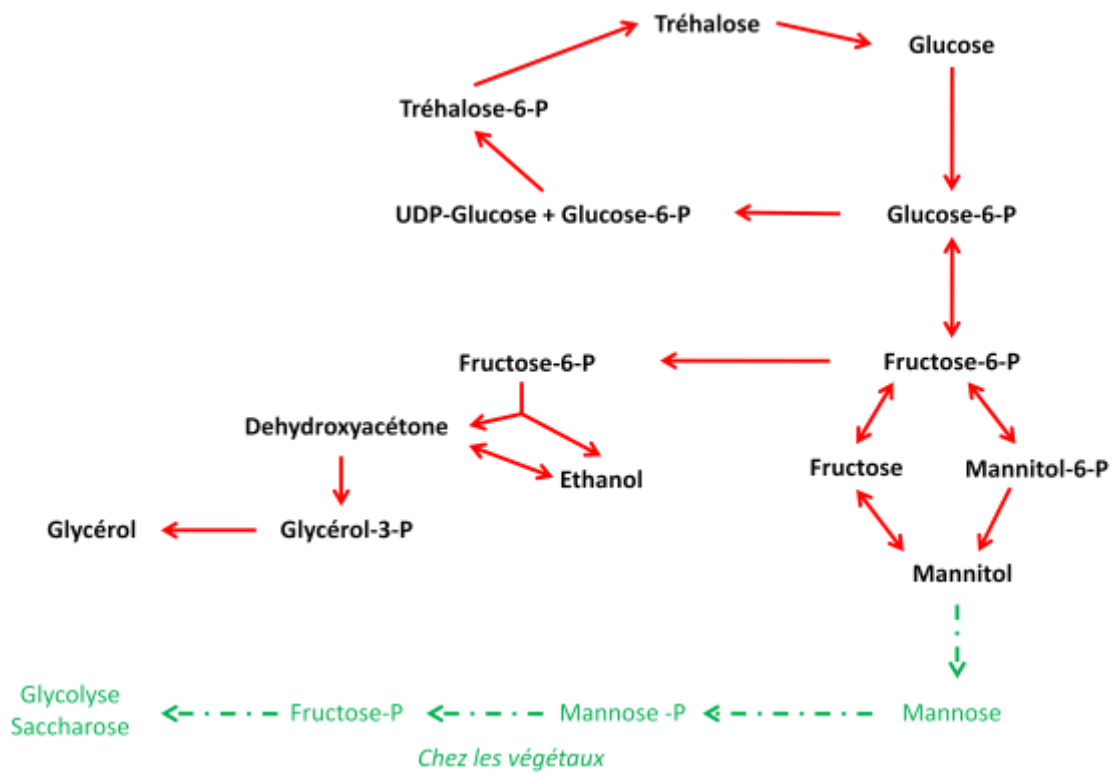




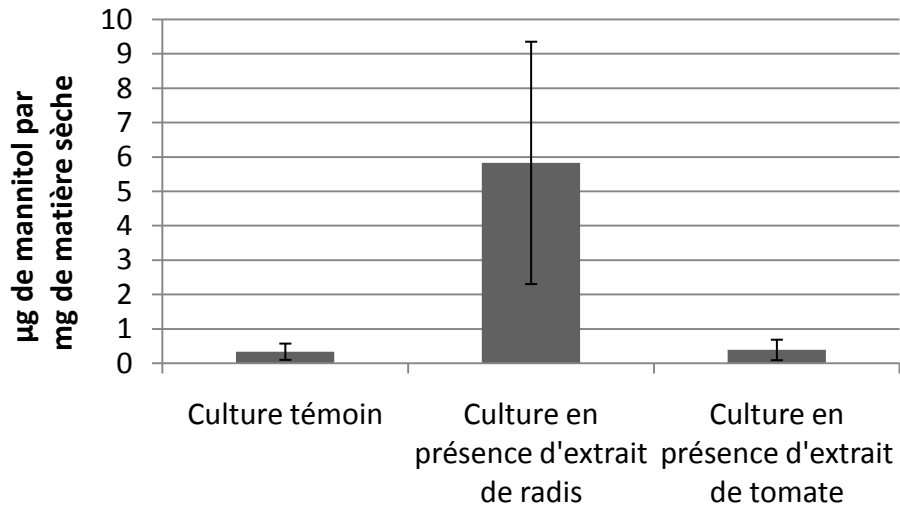
**Figure 44:** Evolution au cours du temps du taux de viabilité des conidies de différents génotypes, conservées sur graines de radis. (\*) Donnée significativement différente du génotype sauvage dans les mêmes conditions au seuil de 1% test de Student.

**Tableau 3:** Rappel des principaux résultats. (S : sensible, HS hypersensible, ≈ : environ, Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student). <sup>1</sup> Selon l'hypothèse que le mannitol est précurseur de la brassicocolin A (Gloer *et al.*, 1988).

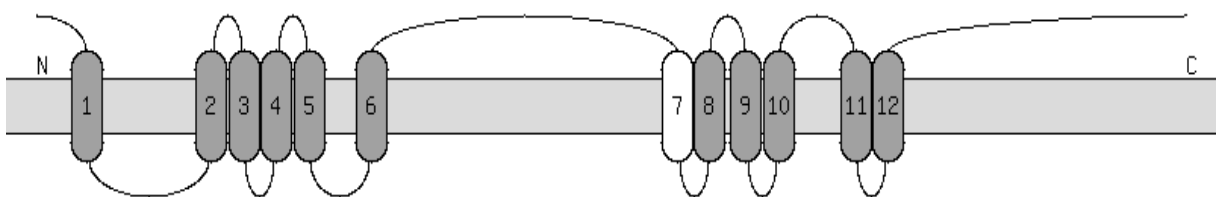
		Ab43wt	AbΔmpd1	AbΔmdh1	AbΔmpd1Δmdh1
Concentration en mannitol en µg/mg DW	Conidies seules	≈ 22	≈ 8 **	≈ 10 **	0 **
	phase précoce	≈ 26	0 **	≈ 35	0 **
	Colonie mature	≈ 16	≈ 10**	≈ 24**	0 **
Brassicocolin A production <sup>1</sup>		<i>Normal</i>	faible	<i>normal</i>	<i>Très faible</i>
Sensibilité à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Tolérant	HS	HS	S
Sensibilité aux ITC		Tolérant	HS	Tolérant	HS
Sensibilité à la brassinine		Tolérant	S	Tolérant	HS
Pénétration des tissus de l'hôte		Normal	faible	normal	<i>Très faible</i>
Virulence		Normal	Normal	Normal	Normal
Agressivité		Normal	<i>faible</i>	medium	<i>Très faible</i>
Sporulation in planta		Normal	faible	<i>Très faible</i>	faible
Sensibilité aux stress matriciel		Tolérant	S	Résistant	HS
Conservation sur graines après 2mois		Normal	faible	Normal	faible



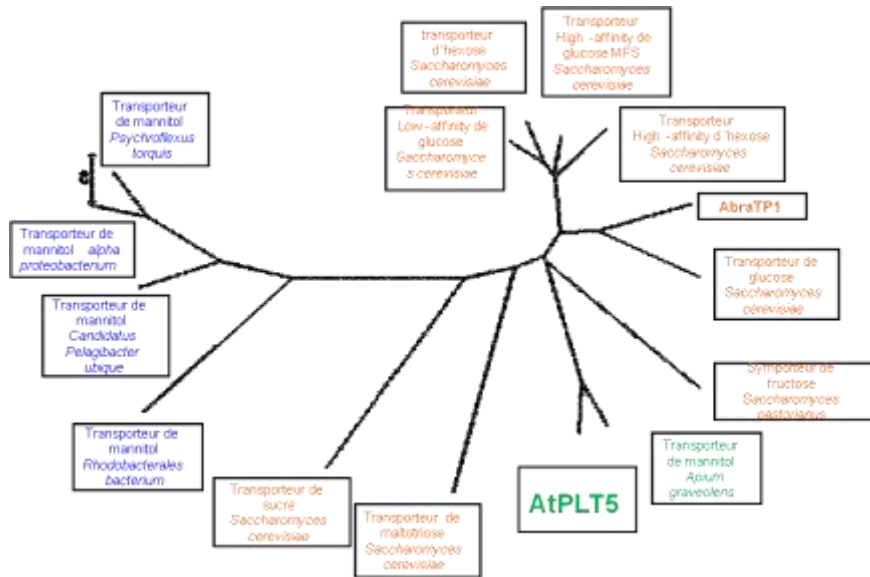
**Figure 45 :** Schéma synthétique des liens entre différents métabolismes des sucres chez les champignons filamenteux (en rouge) (adapté de Dulermo *et al.*, 2010) ou chez les végétaux (en vert) (Biologie Végétale: Raven, Evert et Eichhorn, édition de boek, 6<sup>e</sup> édition).



**Figure 46:** Dosage HPLC du mannitol contenu dans le filtrat de culture du génotype sauvage Ab43wt cultivé dans du milieu PDB supplémenté ou non en extraits végétaux (7 jours à 24°C, 150 rpm).



**Figure 47:** Modélisation de la séquence protéique d'*AbTP1a* prédisant 12 domaines transmembranaires.



**Figure 48:** Arbre phylogénétique (selon la méthode Neighbor Joining) basé sur l’alignement de séquences protéiques correspondant à des transporteurs MFS chez divers organismes.

```

ADNg.Abtp1      ATGGGTCTGGGCAAAGTGTAAGTTGCGATCCGGCTGAAATATGCACCCAGTTATGCTAAC 60
ADNct.Abtp1    ATGGGTCTGGGCAAAGT----- 17
*****

ADNg.Abtp1      TTGCACAGTGCTGTCCGCATACGCGGCCCGAGTGCGGTATCGAAGCCATCATCTTGGT 120
ADNct.Abtp1    -----TGCTGTCCGCATACGCGGCCCGAGTGCGGTATCGAAGCCATCATCTTGGT 69

ADNg.Abtp1      GTGATCACGTCCATAGGTGGTTTCTGTTTCGGTTACGATACGGTATGTACCGTGTATCCT 180
ADNct.Abtp1    GTGATCACGTCCATAGGTGGTTTCTGTTTCGGTTACGATACGG----- 112
*****

ADNg.Abtp1      CTTTTCAATCGTCCAGCGGCTCATCGAAGATAGGGTCAAATCTCTGGAATGCTCATCTTC 240
ADNct.Abtp1    -----GTCAAATCTCTGGAATGCTCATCTTC 138
*****

ADNg.Abtp1      AAGGACTTCATCGAGCGATTTCGGACAGGACCAGGGCAATGGCGAGAAGGCATTCGACCCC 300
ADNct.Abtp1    AAGGACTTCATCGAGCGATTTCGGACAGGACCAGGGCAATGGCGAGAAGGCATTCGACCCC 198
*****
( ... )
ADNg.Abtp1      GTTATCATCGGAGAGACGTTCCCGCTCCGCACTCGTGCGAAGCAAGCCTCTTTGGCTACT 1380
ADNct.Abtp1    GTTATCATCGGAGAGACGTTCCCGCTCCGCACTCGTGCGAAGCAAGCCTCTTTGGCTACT 1278
*****

ADNg.Abtp1      GCGTTCAACTGGCTCGGTAAGCTACACACCTACAACCTAACAAACATACTACTAACGCT 1440
ADNct.Abtp1    GCGTTCAA-----TAACGCT 1338
*****

ADNg.Abtp1      CCATTCAGGTAACTTTTATGATCGGCTTCCTTACCCCTACGCTGATGCCGGTATCGGCT 1500
ADNct.Abtp1    CCATTCAGGTAACTTTTATGATCGGCTTCCTTACCCCTACGCTGATGCCGGTATCGGCT 1398
*****
( ... )
ADNg.Abtp1      ACGAGAGGGTTTAA 1814
ADNct.Abtp1    ACGAGAGGGTTTAA 1712
*****

```

**Figure 49:** Alignement de la séquence génomique (ADNg.tp1) avec une synthèse des résultats des séquençages des ARNm rétrotranscrits ADNc<sup>t</sup>.Abtp1. En vert les ATG théoriques, en rouge les introns prédits. (...) interruption de séquence.

```

AtPLT5      MTGATPENRTAPSPPPVKHVPESVLPKPPKRNNAFACAILASMTSILLGYDIGVMSGA 60
AbTP1t     MGLGKVAVRIRGAECGIEAAILGVITSIG-----GFLFGYDTGQISGMLIFKDFIERFG 54
AbTP1b     -----MLIFKDFIERFG 12
             : * . . : .

AtPLT5      MIYIKRDLKINDLQIGILAGSLNIYSLIGSCAAGRTSDWIGRRYTIVLGAIFFAG-AIL 119
AbTP1t     QDQGNGEKAFDPTIQSLLVSLMSIGTLIGALAGAYTADWFGRRRNLSVGVLFIFIIGNIIQ 114
AbTP1b     QDQGNGEKAFDPTIQSLLVSLMSIGTLIGALAGAYTADWFGRRRNLSVGVLFIFIIGNIIQ 72
             : : :: .:* . :.* :***: *..*:*:*:* * : : .** : * *

AtPLT5      MGLSPNYAFLMFGRFIAGIGVGYALMIAPVYTAEVSPASSRGFLNSFPEVFINAGIMLG 179
AbTP1t     VTAMTTWVHMTIGRIVAGLVGVILSIGVPMYQSEVCPREIRGAVVASVYQLMITVIGILISN 174
AbTP1b     VTAMTTWVHMTIGRIVAGLVGVILSIGVPMYQSEVCPREIRGAVVASVYQLMITVIGILISN 132
             : . . . . . :***:***:* * : .* : * * . * * : : :*:**:*:*:.

AtPLT5      VSNLAFSNLP---LKVGWRMLMGIGAVPSVILAIGVLAMPESPRWLVMQGRGLDAKRVLD 236
AbTP1t     IINFGVRDNPGEDSDAAWRIVIGLGIGFSVPLGLGVLFPESPRWLAGKGRWEEARMAMA 234
AbTP1b     IINFGVRDNPGEDSDAAWRIVIGLGIGFSVPLGLGVLFPESPRWLAGKGRWEEARMAMA 192
             : * : . . : * . . . * : * : * * * . : * : * : * : * : * : .

AtPLT5      KTSDSPTEATLRLEDIKHAAGIPADCHDDVVQVSRRNSHGEGVWRELLIRP---TPAVRR 293
AbTP1t     RLRG-----LVHDPNHELVNSDFKEMEDSINEQQSAGQGTWMECFTGQPSGIPLLAY 286
AbTP1b     RLRG-----LVHDPNHELVNSDFKEMEDSINEQQSAGQGTWMECFTGQPSGIPLLAY 244
             : . * . : : * : : . . . . . * : * . * * : * :

AtPLT5      VMIAAIGIHFFQQASGIDAVVLFSPRIFKTAGLKTHQQLLATVAVGVVTSFILVATFLL 353
AbTP1t     RTLLGCCALQFFQHQWTGVNYFFYYGATIFQSAGIDDPLQVQLILGAVNVVMT--VPGLWLI 344
AbTP1b     RTLLGCCALQFFQHQWTGVNYFFYYGATIFQSAGIDDPLQVQLILGAVNVVMT--VPGLWLI 302
             : . . : * * * * : * : . . . . * * : * * : : . * :

AtPLT5      DRIGRRPLLLTSVGGMVLSLAALGTSLTIIIDQSEKKVMWAVVVAIATVMTYVATFSIGAG 413
AbTP1t     ERVGRR--VPLVVGGGLWQAVWLLIFAIIGVVLPPQDNPAAGIVMIVAACMFIAFASTWG 402
AbTP1b     ERVGRR--VPLVVGGGLWQAVWLLIFAIIGVVLPPQDNPAAGIVMIVAACMFIAFASTWG 360
             : * : * * : * * : : * : : . . * : * * . . : * : * :

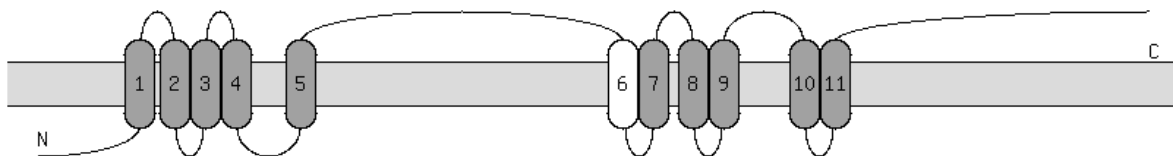
AtPLT5      PITWVYSSEIFPLRLRSQGSHSMGVVNVRTSGVISISFLPMSKAMTTGGAF-YLFGGIAT 472
AbTP1t     PFIWVIIGETFPHLRTRAKQASLATAFNWLGN--FMIGFLTPYADAGIGYAFGFVFFACNF 460
AbTP1b     PFIWVIIGETFPHLRTRAKQASLATAFNWLGN--FMIGFLTPYADAGIGYAFGFVFFACNF 418
             * : * * . * * * * * : : * : . . . . * : . : * . * * . * * * : * : .

AtPLT5      VAVVFFYTFLEPETQGRMLEDMDELFS-----GFRWRDSKSKPKGNPEKTV 517
AbTP1t     IAAGIVYFFVFETKLSSLEHNVDIMYSDPNISARTSKKWIPAGYISRNERDDSHYWERRHSA 520
AbTP1b     IAAGIVYFFVFETKLSSLEHNVDIMYSDPNISARTSKKWIPAGYISRNERDDSHYWERRHSA 478
             : * . . * : * * . * * : * * * : * : * : * : * : . . . .

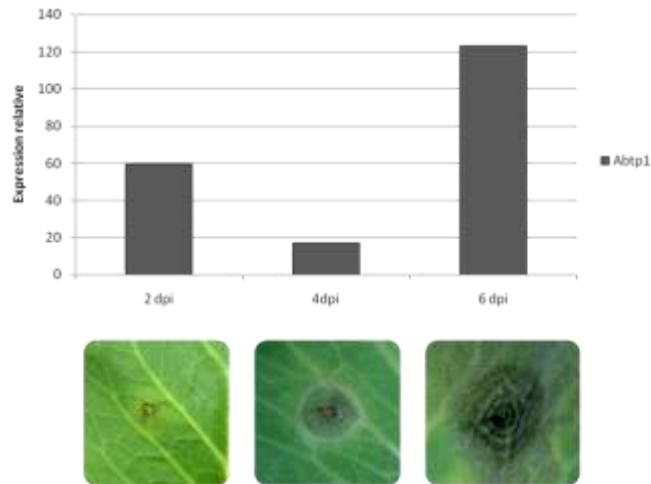
AtPLT5      PNPEVEIGSNKQWKEGDTQSS----- 538
AbTP1t     VGATGAVASEKVGDKDVDTSPERGMSHTHEHRV 552
AbTP1b     VGATGAVASEKVGDKDVDTSPERGMSHTHEHRV 510
             .. . * : * . . . * .

```

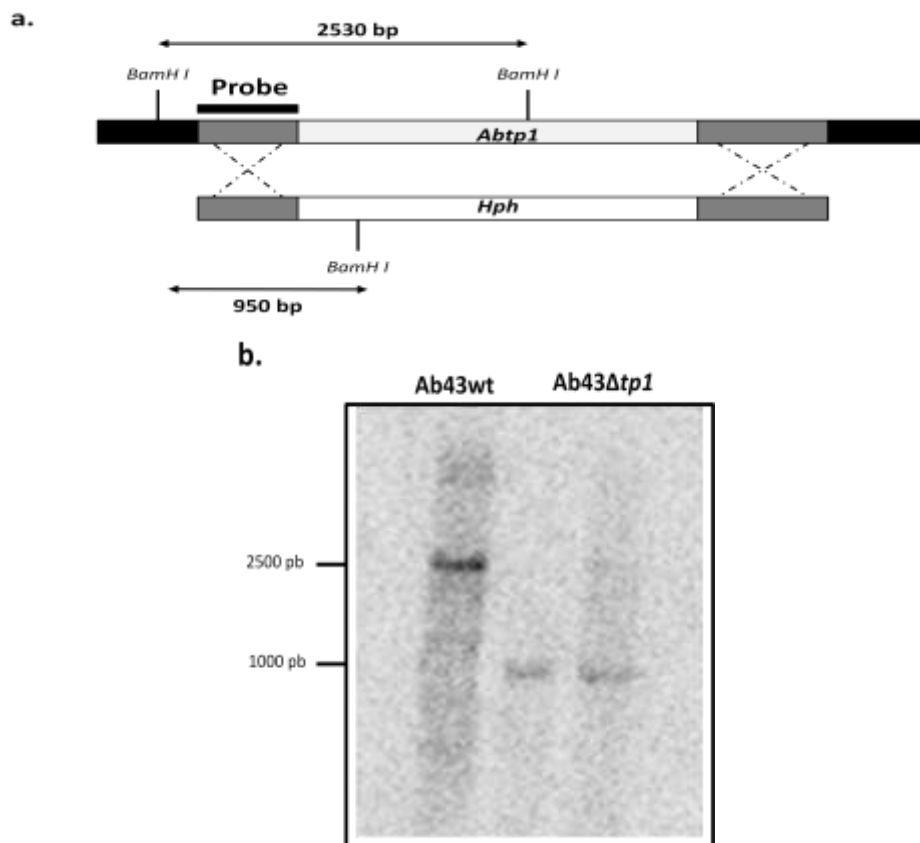
**Figure 50:** Alignement des séquences protéiques du transporteur de mannitol AtPLT5 avec AbTP1t et AbTP1b prédite chez *A. brassicicola* (en jaune les séquences consensus caractéristiques des MFS transporteurs de sucres conservées et en bleu les séquences consensus dégénérées).



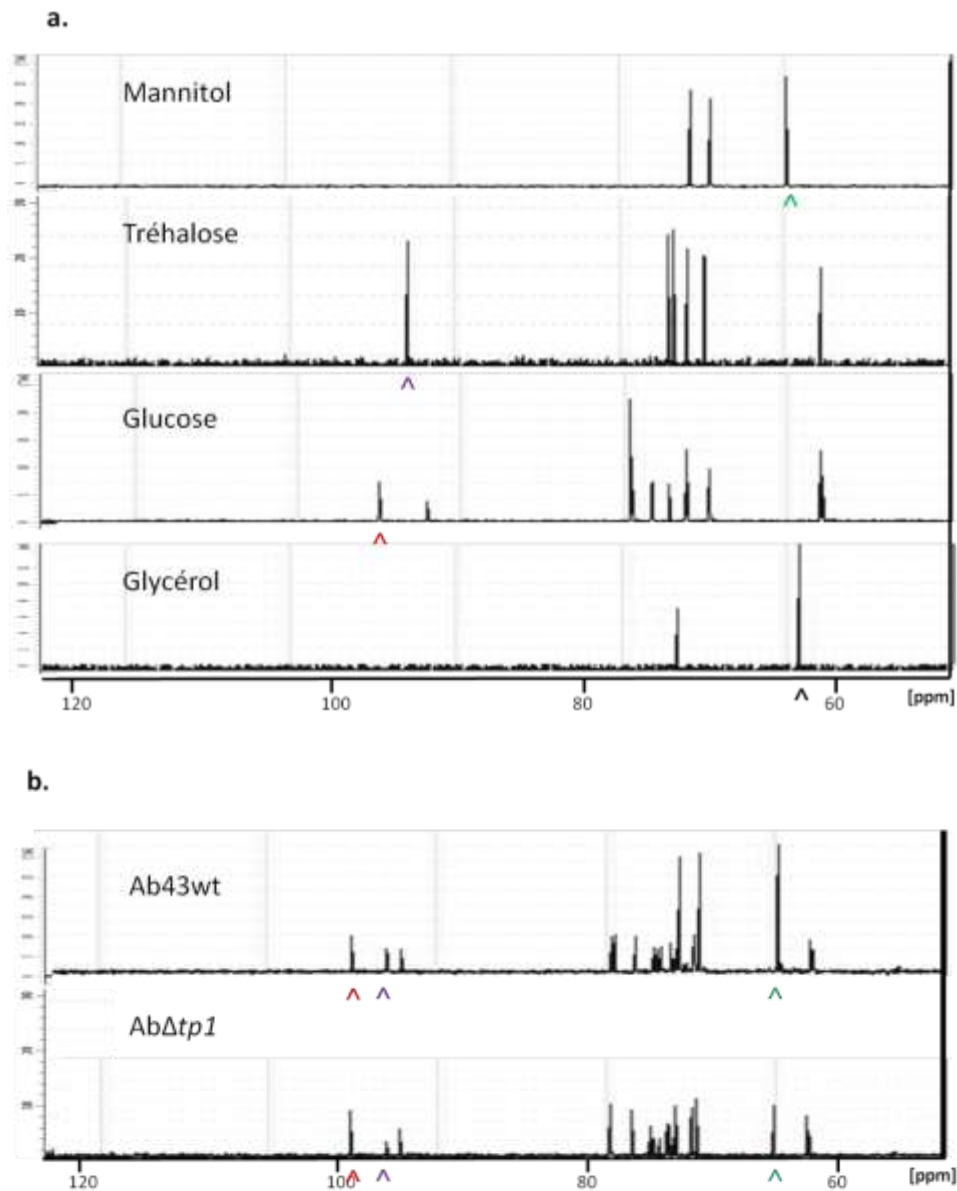
**Figure 51:** Modélisation de la séquence protéique d'AbTP1b prédisant 12 domaines transmembranaires.



**Figure 52:** Expression relative du gène *Abtp1* par RT-qPCR au cours d'une cinétique d'infection sur chou.

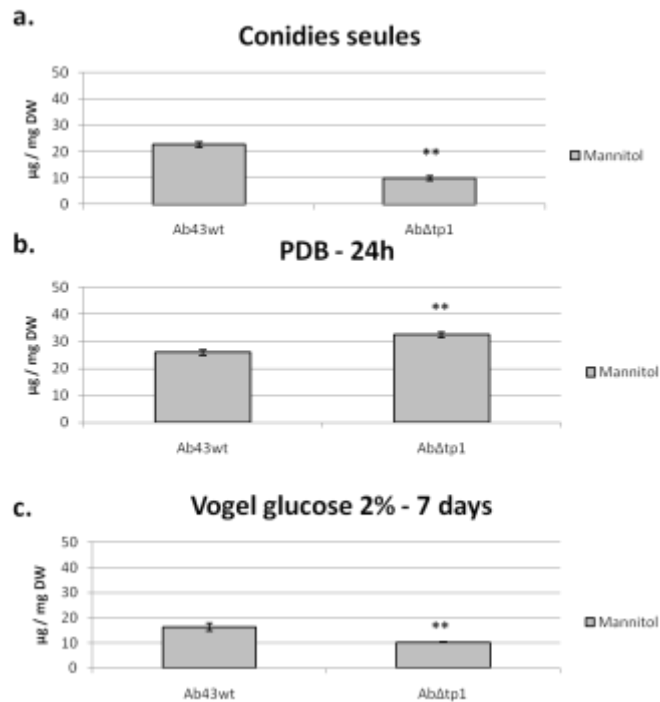


**Figure 53 :** Inactivation du gène *Abtp1* par recombinaison homologue. Schéma de la recombinaison homologue entre la séquence génomique d'*A.brassicicola* et la cassette de mutation incluant la sonde utilisée pour le Southern-blot et les sites de restrictions **(a)**. Résultats d'hybridation à partir d'ADN génomiques du génotype sauvage et des mutants digérés avec *BamH I* **(b)**.

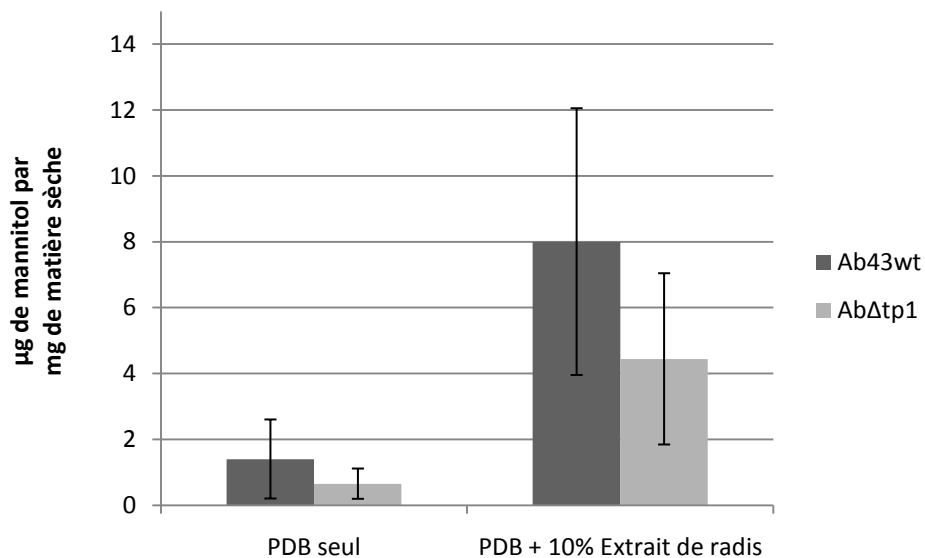


**Figure 54:** (a) Spectres RMN de différents sucres ou polyols purs. (b) Spectres RMN d'extraits de sucres solubles issus du génotype sauvage et des mutants *Abtp1* d'*A. brassicicola* (7 jours de cultures, Vogel + 2% de glucose, 150 rpm, 24°C). Signaux spécifiques du mannitol: flèches vertes, signaux spécifiques du glucose: flèches rouges, signaux spécifiques du tréhalose: flèches violettes, signaux spécifiques du glycérol: flèches noires.

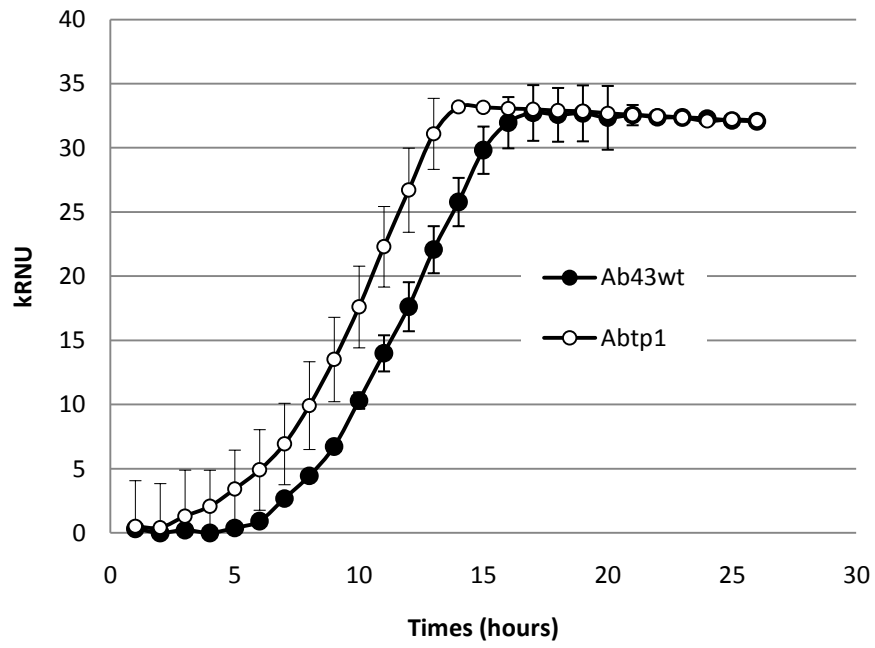




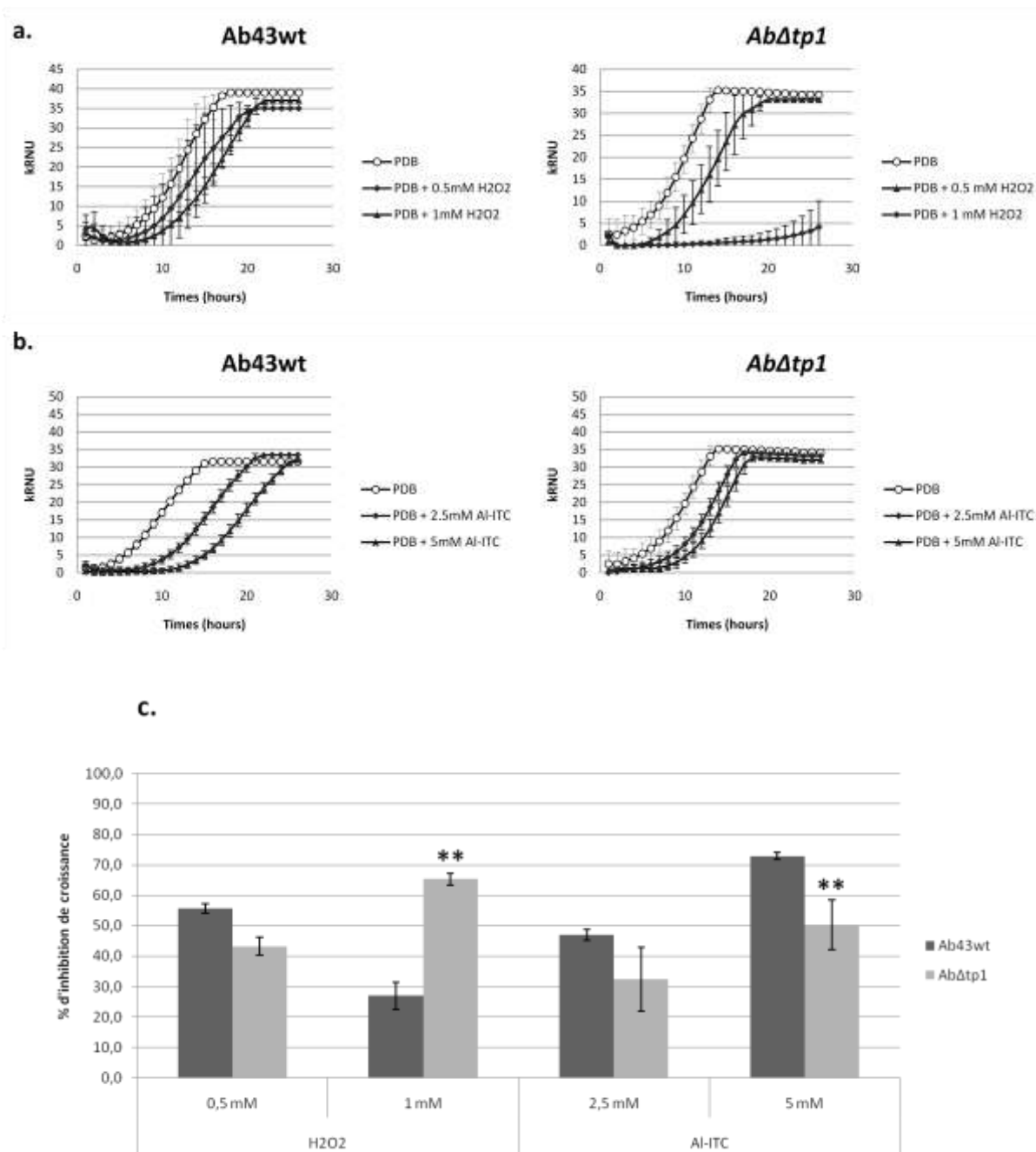
**Figure 55:** Dosages HPLC du mannitol extrait du génotype sauvage et des mutants d'*A. brassicicola* issus soit des conidies seules **(a)** soit d'une culture de 24h **(b)** soit d'une culture de 7 jours **(c)**. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



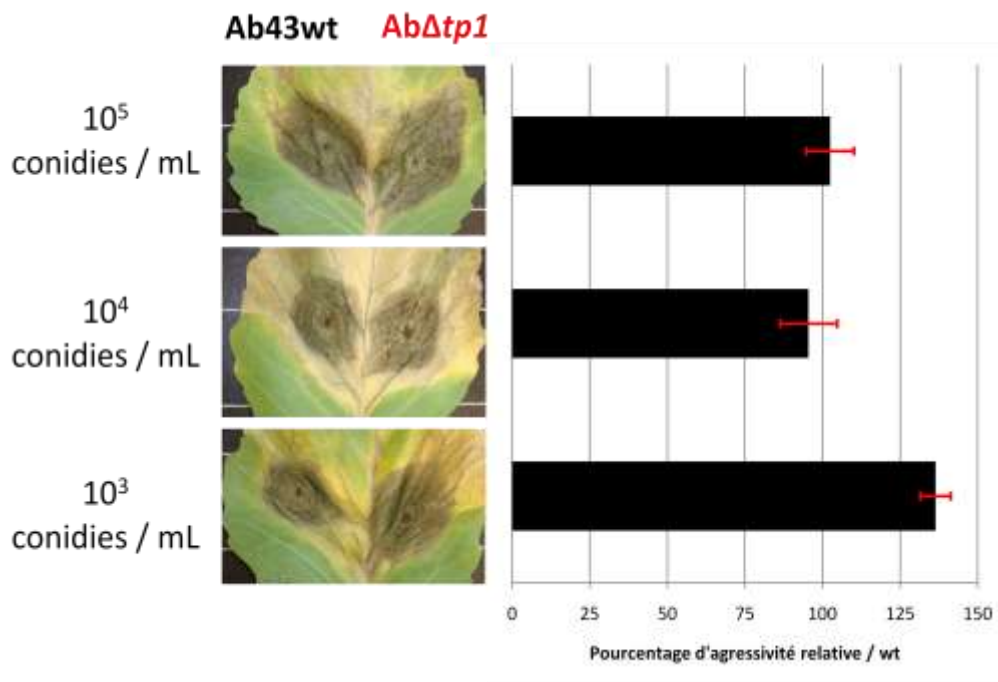
**Figure 56:** Dosage HPLC du mannitol contenu dans le filtrat de culture du génotype sauvage Ab43wt et des mutants AbΔtp1 cultivé dans du PDB (7 jours à 24°C, 150 rpm) en présence ou non de 10% d'extrait de feuilles de radis. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



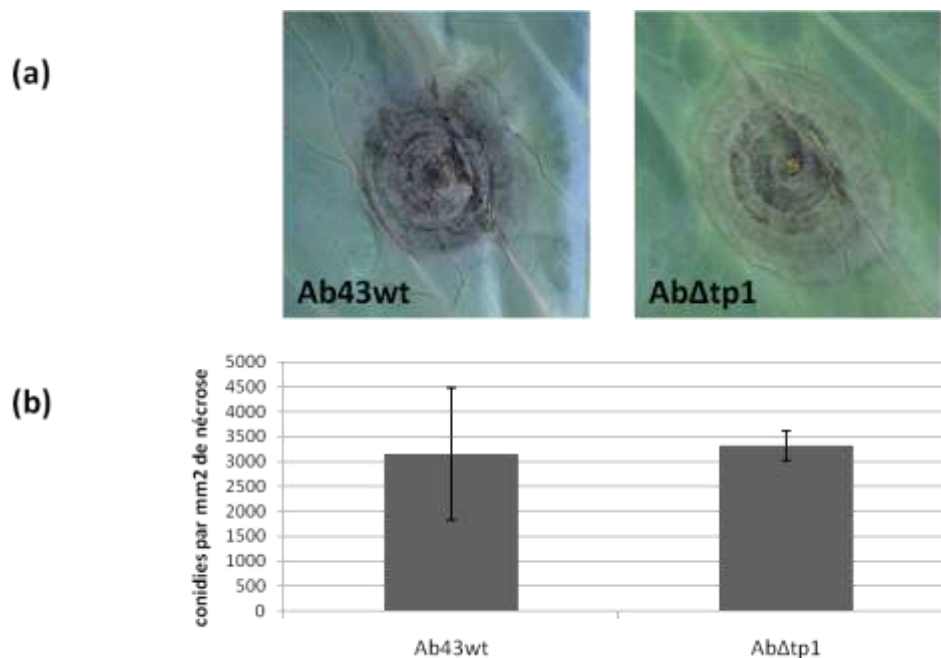
**Figure 57:** Cinétique de croissance par néphélométrie du génotype sauvage et des mutants *Abtp1*.



**Figure 58:** Représentation graphique de cinétiques de croissance par néphélométrie pour évaluation de la sensibilité des mutants *AbΔtp1* par rapport au génotype sauvage en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a) ou d'AI-ITC (b). (c) Pourcentages d'inhibition de croissance calculés à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



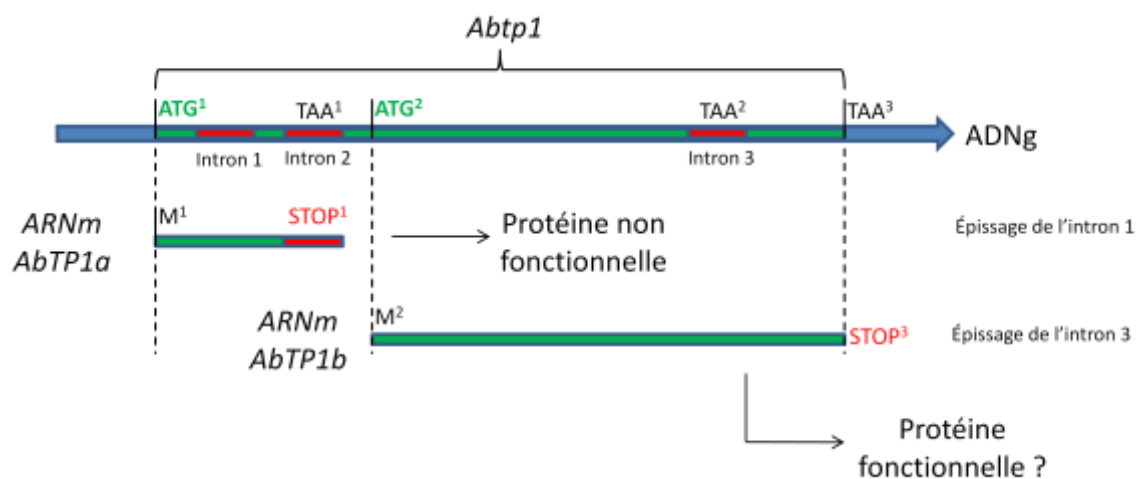
**Figure 59:** Expression du pouvoir pathogène sur chou de différents génotypes d'*A. brassicicola* inoculés à différentes concentrations en conidies (6 jours après inoculation).



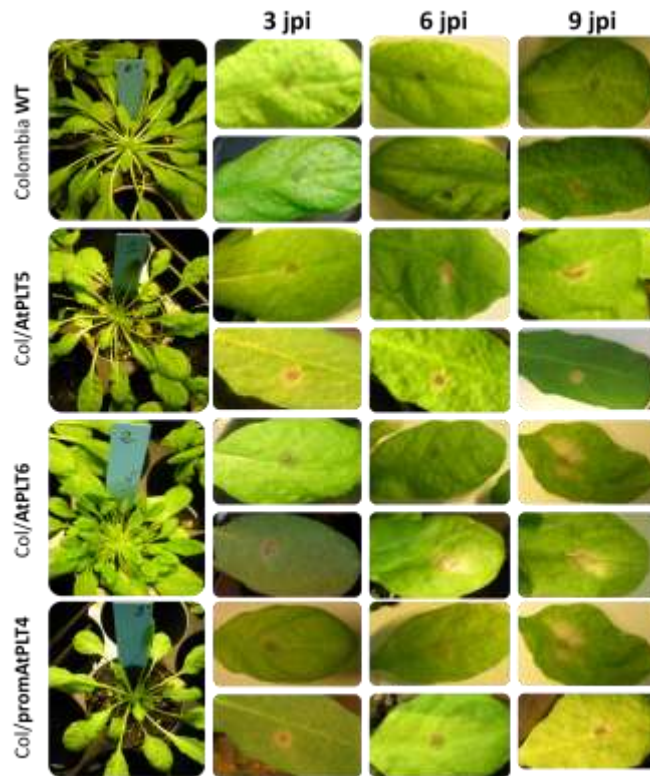
**Figure 60:** (a) Photographie (x40) des symptômes provoqués par différents génotypes d'*A. brassicicola* sur chou, 6 jours après inoculation et (b) quantification de la sporulation in planta. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

**Tableau 4 :** Rappel des principaux résultats. (S : sensible, HS hypersensible, ≈ : environ, Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

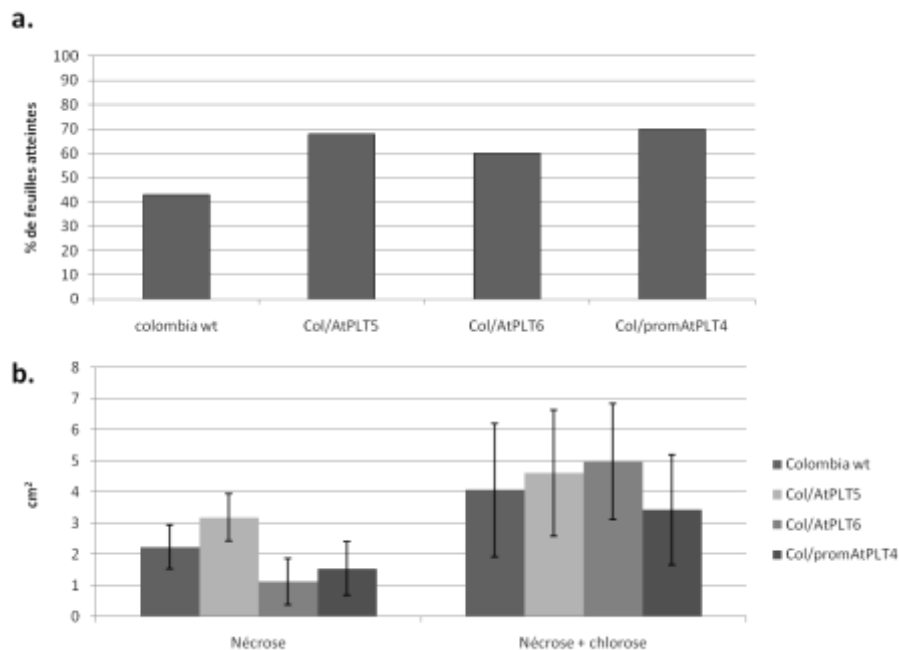
		Ab43wt	AbΔtp1
Concentration en mannitol en µg/mg DW	Conidies seules	≈ 21	≈ 10**
	phase précoce	≈ 25	≈ 32**
	Colonie mature	≈ 16	≈ 10**
Sensibilité à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Tolérant	S
Sensibilité aux AI-ITC		Tolérant	Tolérant
Virulence		Normal	Normal
Agressivité		Normal	Normal
Sporulation in planta		Normal	Normal



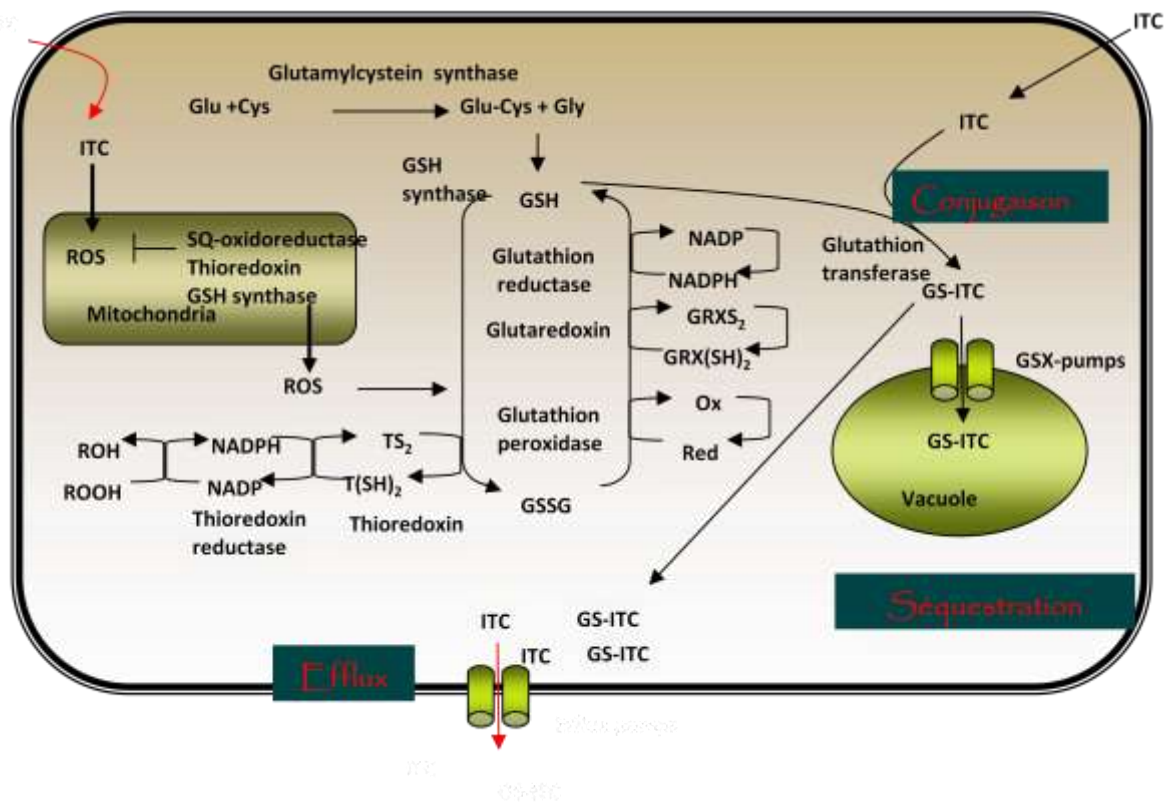
**Figure 61 :** Schéma d'une potentielle régulation post-transcriptionnelle du gène *Abtp1* par épissage alternatif.



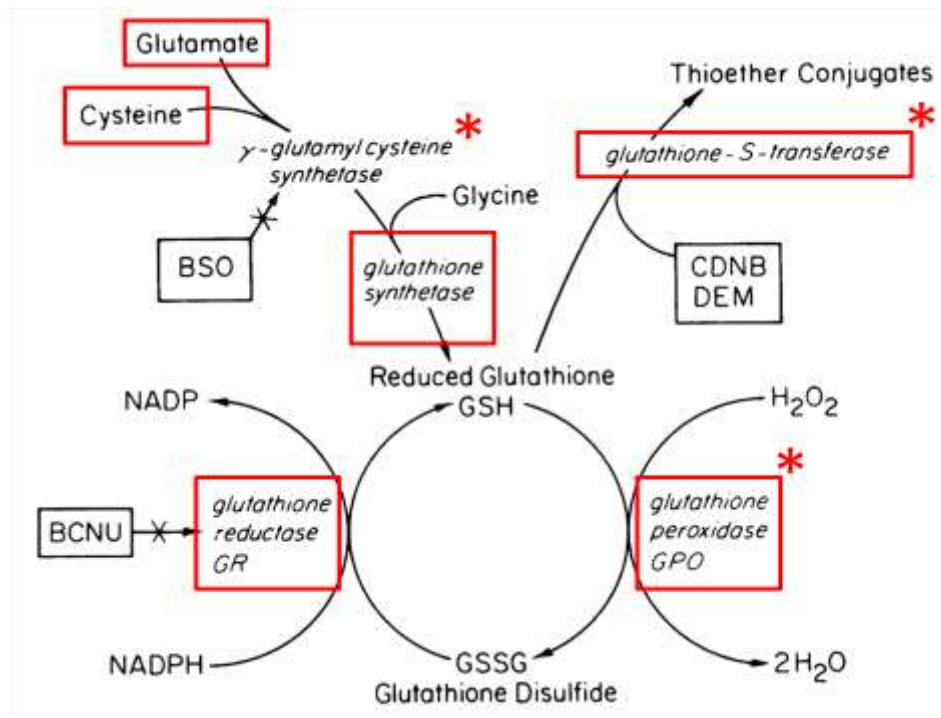
**Figure 62:** Photographies de symptômes provoqués par 5  $\mu$ l d'*A. brassicicola* à  $10^5$  conidies par ml après 3, 6 et 9 jpi (jours post inoculation) chez différents génotypes d'*A. thaliana*.



**Figure 63:** (a) Pourcentage de feuilles des différents génotypes d'*A. thaliana* présentant des symptômes évolutifs 9 jours après inoculation de la souche sauvage d'*Alternaria brassicicola*. (b) Surface moyenne des symptômes d'alternariose observés par génotype.



**Figure 64 :** Modèle hypothétique de l'action des ITC et des mécanismes potentiels de détoxification chez *A. brassicicola* selon Sellam (thèse de doctorat, 2007).



**Figure 65 :** Cycle redox du glutathion (Harlan *et al.*, 1984).  **$\gamma$ -GCS:**  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, **GST:** glutathion S-transferase, **G6PDH:** glucose-6-phosphate dehydrogenase, **GR:** glutathione reductase, **GPx:** glutathione peroxidase, **BSO:** buthionine sulfoximine, **CDNB:** 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, **BCNU:** 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. **Encadré en rouge :** protéines codées par des gènes surexprimés chez *S. cerevisiae* en présence d'ITC, **\*** : protéines codées par des gènes surexprimés ou voies métaboliques induite chez *A. brassicicola* en présence d'ITC (Sellam *et al.*, 2006).

**Tableau 5 :** Caractéristique des séquences introniques mises en évidence chez les 6 gènes codant les AbGST sélectionnées. Les nucléotides qui diffèrent des séquences consensus définies chez les champignons sont indiquées en gras (Unkles, 1992). Pb : paire de base.

GST	Taille de l'ORF (pb)	Nombre d'intron	N°	Taille (pb)	Position / ATG (pb)	Séquence en 5'	Séquence en 3'
1	1068	3	1	91	38	GTAAG	CAG
			2	144	442	GTAAG	CAG
			3	53	650	GTAAG	CAG
2	751	1	1	67	141	GTAAT	CAG
3	817	1	1	49	549	GTATG	<b>GCT</b>
4	595	1	1	130	32	GTACG	TAG
5	867	1	1	64	209	GTAAG	TAG
6	845	2	1	54	76	GTGCG	<b>ACG</b>
			2	57	639	<b>GTAA</b>	GCA
Éléments consensus des champignons filamenteux						GTRNG	YAG



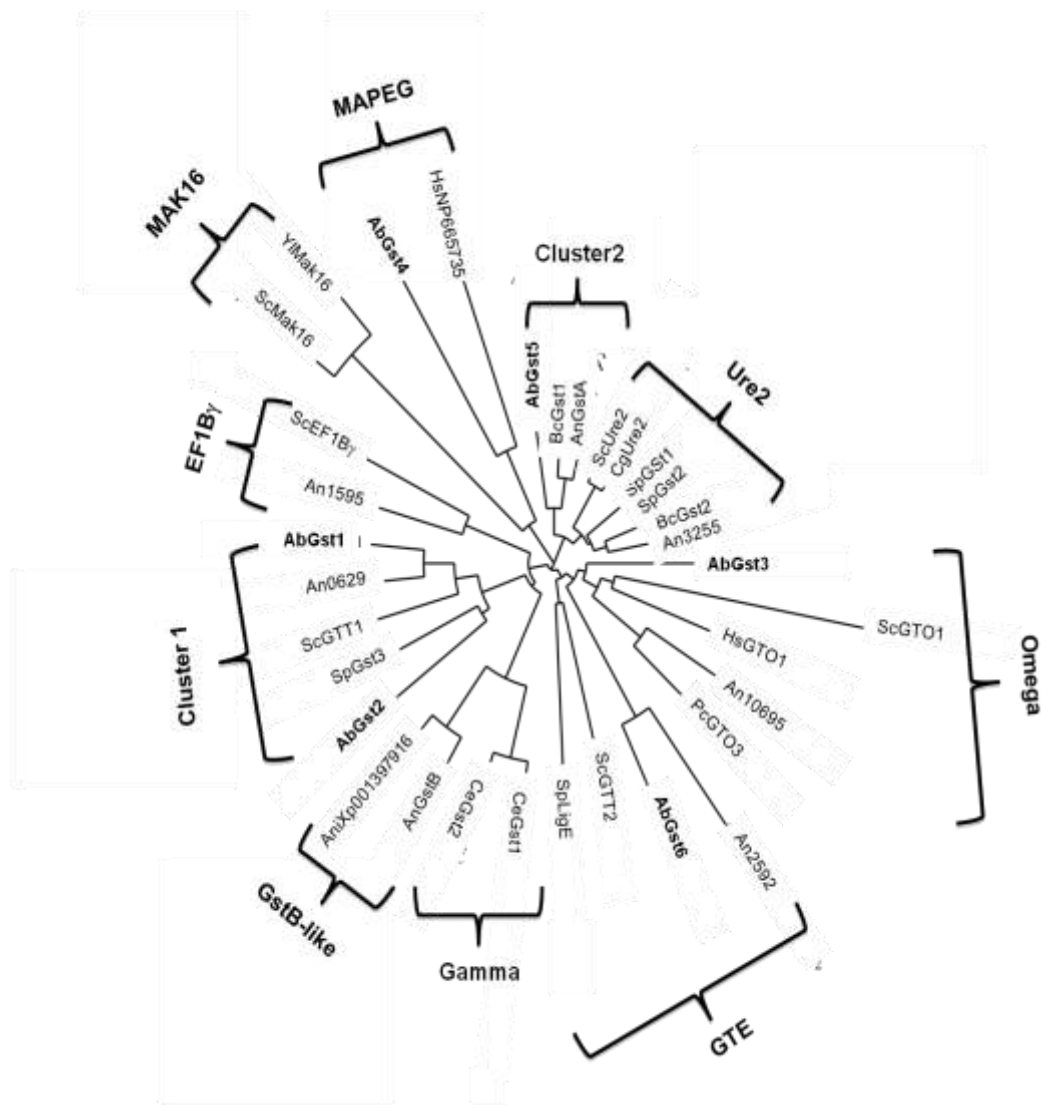


Figure 66: Classification phylogénétique des six GST d'*A. brassicicola* sélectionnées.

```

BcGST1      -----MASQSDIHLYTTQTPNGIKISITLEEL----GLSYEVHKIDISKNTQKEP-W 47
AnGSTA     -----MSRPDITLYTAQTPNGIKISIALEEL----GIPYKVEKIDISKNVQKEP-W 46
AbGST5    MSDQEPTGLKADKGIELLTFGTPNGWKASILLEELKDAYGKDYTWQAINISKNTQKEP-W 59
SpGST3     -----MLEEL----KVPYEIKVYDR-VDGRAPP-A 24
AbGST1    -----MSNQQGAKITVHWLNKSRQRIVWLLEEL----GLEYDIAVYKRDKNKRAGL-D 49
ScGTT1     -----MSLP I I K V H W L D H S R A F R L L W L L D H L N ----L E Y E I V P Y K R D A N F R A P P - E 46
AbGST2    -----MTLIVHHLQRSQSERIVWLCEELG----IDYELKIYKRDRATLGAPSD 44
                : . *                *                .

BcGST1      FLEINPNGRIPALTDTFTDGKK-INLFESGSIQQYLVDRYDTEHKISYPK-----G 97
AnGSTA     FLEINPNGRIPALTDTFTDGQK-IRLFESGSILTYLAEQYDKDYKISYPR-----G 96
AbGST5    FTKLGPNGRIPVIVDHDQG---FAVQEGLAILTYLTRHYDPEHKFSFS-----D 106
SpGST3     YTKLSPLGKSPFVVD---DG---VTYIESAAILEHLVRKYGPSFKPSEE-----D 68
AbGST1    LKAVHPLGKSPTVAIRPANSEKDIVITESETIMEYICDHFGKHLIPARYPEGQEGVLGDE 109
ScGTT1     LKKIHPLGRSPLLEVQDRETGKKKILAESGFIFQYVLQHFHSHVLMSED----- 96
AbGST2    LKAIHPTGTAPVIQDGD-----VTMSECGAIMDYIIGKYANGALTIPSN----- 88
                : * * * * :                * * * * : : : :

BcGST1      TREYYEVNNWLFNAGVGPMQQANHFSK----YAPERIEYGINRYTN-----ET 144
AnGSTA     TREYYETISWLYFQNAGVGPMQQANHFSR----YAPERIEYGVNRYVN-----ET 143
AbGST5    PLDVSRAEQWMAWHGLGPMQQANHFNR----FAKERIAYGMQRYTG-----ET 153
SpGST3     VAELEKYELWMHFSEASLMPFIWASHVLDLSV-NMTPIFFRYIVRQFVNGIKSKYLSKET 127
AbGST1    TEEWMRYKFLMDYTEGSLFTVLILALVTGNIKSAPVPFLKPITNGVASKIDSGFVNPEL 169
ScGTT1     ADIADQINYYLFYVEGSLQPPLMIEFILSKVKDSGMPFPISYLARKVADKISQAYSSGEV 156
AbGST2    APNFSDYVFWHGIGTFQNATMTLINVRMAGVENHPILQALNKKITN----- 137
                : . .                : . .

BcGST1      RRLYSVLNTHLEKSTS--GYLVGDRCTIADIAHWGWVT-AAFYSGVDIEEFPALKAWDER 201
AnGSTA     RRLYGVLDKHLANSKS--GYLVGDHITIADISHWGWA-AAGWAGVDIDEFPHLKAWDER 200
AbGST5    ERLAGVLDAALAKS---DYLVGNKFSIADIASFGWIH-MLRISGVDLSFPNLKKWWER 208
SpGST3     FLNLDYIDNHLASN---EYFAGEQFTAADPQMCFPIF-AAQRDYLSQKPYKNIKRWMRV 182
AbGST1    KTHFDFLEDYLVKSPSKGEFFCSDKLTAADIMIHFGLEGAAQRVPLSETSYPKLYEYMRR 229
ScGTT1     KNQFDFVEGEISKNNG---YLVDGKLSGADILMSFPLQMAFERKFAAPEDYPAISKWLKT 213
AbGST2    --ALDMMNRRLLES----TWLAGDNFTAADIYAVFIVTTMRLFTPFPLSGYSGIKRWLEN 191
                . : : . .                : : : :

BcGST1      MEKRPVVEKGRHVPDP-----HNIGALKKDPEREAKMKAAAEKGR-EWIQAGMKSDAKK 254
AnGSTA     LAAREGVEKGRHVPS-----HTIKDLLK---KKKAEEIAAQGR-AWVQEGMKNDAAK 250
AbGST5    VLARPAVQRGLEIPSKSGFGNDTYVQKMKEDPEFAEKEHKLAEQIKTAKEQYGYKYSSP- 267
SpGST3     VSDRPACRIAAEKVED-----NTLTLFSDVERYSHPPPTPPPEQVR-----SDE-- 225
AbGST1    LQKRDAYKNAAKRVEEASG---ETYVPFSDAKL----- 259
ScGTT1     ITSEESYAASKEKARALG-----SNF----- 234
AbGST2    VRNRPAYRKMIEKAEQNEN---RGEVPVFCDEAPRPMISY----- 228
                : . .                :

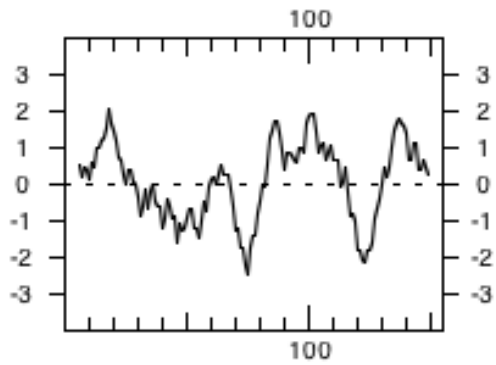
```

**Figure 67:** Alignement des séquences protéiques des AbGST1, 2 et 5 avec les GST caractéristiques des clusters 1 et 2 selon McGolrick *et al.* (2004). Comme dans l'article cité, les séquences consensus N-terminales sont notées en rouge, les séquences de type SNAIL/TRAIL et les motifs N-capping sont respectivement notés en vert et bleu ; les motifs caractéristiques du cluster 2 sont notés en mauve ; la *thioredoxin-specific cis Pro* est surlignée.

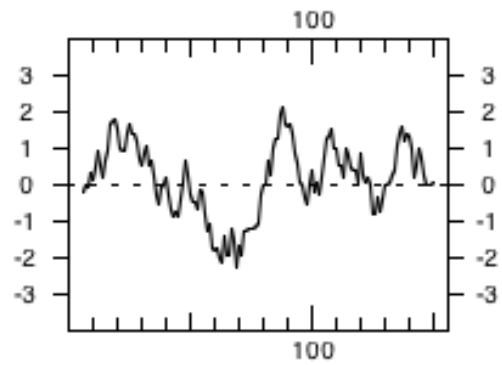
a.

MAPEGHS	-----MVDLTQVMDDEVFMAFASYATIIILSKMMLMSTATAFYRLTRKVFANPEDCVAFGK	55
<b>AbGST4</b>	----- <b>MAIQIPSEYGYVLAACVSTSFVG-AWHAGRVGSFR--KAAKIPYPYASYEQ</b>	<b>51</b>
	:: . : .. :. . : * :	
MAPEGHS	GENAKKYLRTDDRVE-RVRRRAHLNDLENIIPFLGIGLLYSLSGPDPSTAILHFRLFVGAR	114
<b>AbGST4</b>	<b>VQTASPOQSRAMLAFNATQRAHQNFENHVTALGAMLITGLRHP-VAAAVLGAVWSVNRV</b>	<b>110</b>
	* . . . * : : * :	
MAPEGHS	IYHTIAYLTPLPQPNRALSFFVGyGVTLsMAYRLlKSKLYL-----	155
<b>AbGST4</b>	<b>IYAIGYSRSGEDGGKGRYyGALGMVAHYVLMMSGKAAYDLVMG-----</b>	<b>154</b>
	* . . * : :	

b.



hydropathy plot of AbGST4



Hydropathy plot of human MAPEG

**Figure 68: (a)** Alignement de la séquence protéique d'AbGST4 avec les GST caractéristiques de la famille MAPEG selon Bresell *et al.* (2005). Les régions spécifiques de la sous-famille MGST1 sont notées en rouge, en bleu les régions spécifiques de la sous-famille des MGST3 et en jaune le motif ASN78 conservé dans les GST de la famille MAPEG. **(b)** Profils d'hydrophaties d'AbGST4 et d'une MAPEG humaine.

TRX domain

```

abgst3          MSGESARSLGKGSAPPGVPEGS-----IRIYSRMFCCPFAERTRLVLKAKGIRHEVININ 55
HsGT01          MSGESARSLGKGSAPPGVPEGS-----IRIYSRMFCCPFAERTRLVLKAKGIRHEVININ 55
PcGT03          MPIPDEKIFPHATGAAAKTVEQHQPQELVIFYAGWFCCPFVQRTWIALEERGIPIYQYKEVN 60
                *. . . : : : . . . . . * . . . : : * : * * * * . : * * . : * * : : * *
abgst3          LKNKPEWFFKKNPFGLVPVLENSQGQLIYESAITCEYLDEAYP--GKKLLPDDPYEKACQ 113
HsGT01          LKNKPEWFFKKNPFGLVPVLENSQGQLIYESAITCEYLDEAYP--GKKLLPDDPYEKACQ 113
PcGT03          PYKKEKHFLDINPKGLVPAIEY-KGKALYESIILCEFLEDAYPNYKPKLLPEDPFERAYA 119
                : * : * : . * * * * . : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
abgst3          KMILELFSKVPSLVGS-FIRSQNKEDYAGLKEEFRKEFTKLEEVLTNKKTTFFGGNSISM 172
HsGT01          KMILELFSKVPSLVGS-FIRSQNKEDYAGLKEEFRKEFTKLEEVLTNKKTTFFGGNSISM 172
PcGT03          RIWLDYISKSIIPANFRLIQAQTPEKQQEALADFNKALKQFAEKIKG---PYFLGEQFSL 176
                : : * : * * . . . : * : * . * . . : * * . : : : * . . . . : * * : * * :
abgst3          IDYLIWPWFERLEAMKLNECDHTPKLKLWMA-AMKEDPTVSALLTSEKDWQGFLELEYLQ 231
HsGT01          IDYLIWPWFERLEAMKLNECDHTPKLKLWMA-AMKEDPTVSALLTSEKDWQGFLELEYLQ 231
PcGT03          VDIAIVPWIVRDYIIAENRGFKREDIGSKWVEYASKLEKRDSVARTSSEHYAEIYGRYLR 236
                : * * * * : * : * . . . . . * : * * : * . * * . . . : : * * :
abgst3          NSPEACDYGL----- 241
HsGT01          NSPEACDYGL----- 241
PcGT03          DEAQSEAAKATRAGRDIP 254
                : . . . :

```

**Figure 69:** Alignement de la séquence protéique d'AbGST3 avec les GST caractéristiques de la famille *Omega* selon Morel *et al.* (2009). Les Acides Aminés conservés impliqués dans la fixation du glutathion sont notés en bleu ; en rouge, le Glu155 essentiel aux GST de la classe *Omega* (Schmuck *et al.*, 2008).

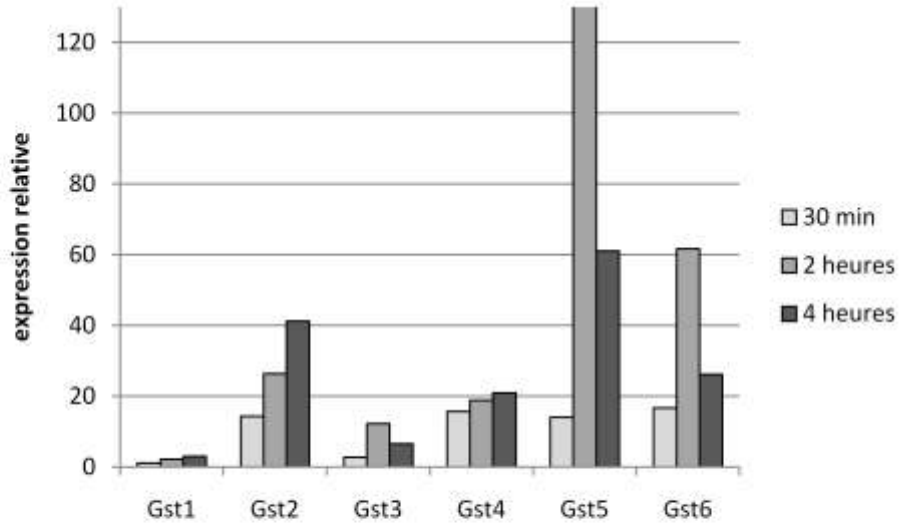
```

ligE            MARNNTITLYDLQLESGCTISPYWRTKYALKHKGFDIDIVPGGFTGILERTGGR----- 55
Abgst6        -MPSSKVVLYDLPGQOGTAWSLNPWKTRMLNYRKIDYTTEWVEFDLAPKFTLGIPPN 59
                . . . . * * * * . : * : * * * * . : * * * * * * * . . . . :
ligE            -----SERVPVIVDD-GEWVLDSWVIAEYLDEKYPDRPMLFEGPTQKNLMKFLDNW 105
Abgst6        PKDAPGYFADYSSPVIKHANGTYQMDSWPIAFELEKQHPSSLHDDPIVEKIRDHIP-- 117
                . * * * . * : * * * * * * * * * * * . . : . . . * . : : . . :
ligE            LWSTAVGPWFRCYILDYHDSLPQ-DRDYVRWSREQWFLGGQRLEDVQAGREDRLPLVPP 164
Abgst6        ---KLIGPLVPLLIPQIPMAVLNKPSADYFYETREKMFGKPVDQVGKDANVEEWERTKA 174
                . : * * . * : * : . * * . : * * : * . : * * . * . . .
ligE            TLEPFRRILAETKWLGGDQPNFADYSALAVFLWTASVARTPPLTEDDPLRDWLDRGFDFL 224
Abgst6        PAKEAGDLLRN---NGGPYFLGQTVSYADFIFVSTLHFVKCISEN-----LF 218
                . : . : * : . * . . : : * * : * * : . : * * : * *
ligE            DGLGRHPGMNPLFGLKLREGDEPFVRQTGPAGAGGQALNKGPQTTKMPPRVAEKAD 281
Abgst6        KELMALDDAFP---KIYEASKQWLERED----- 243
                . * . * * * : * . . : : * :

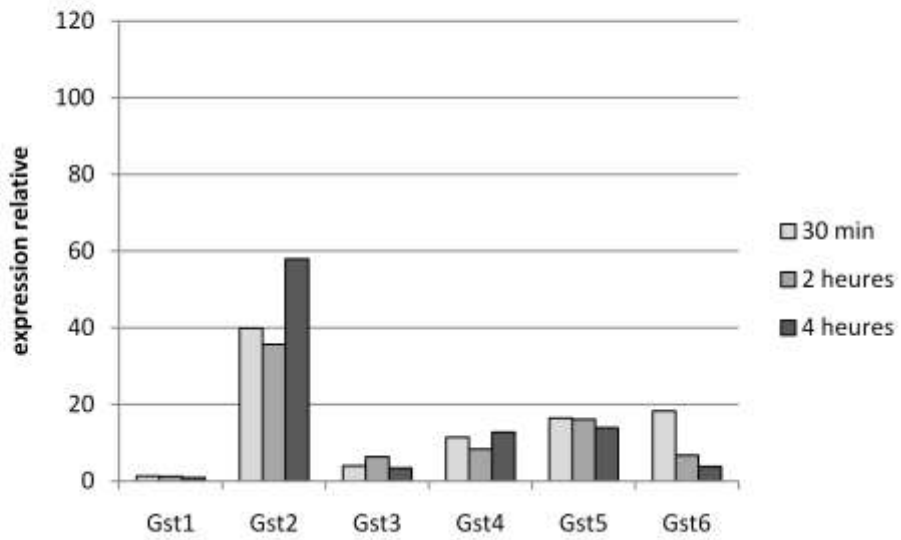
```

**Figure 70:** Alignement de la séquence protéique d'AbGST6 avec les GST caractéristiques de la famille *GTE* selon Morel *et al.* (2009). Les Acides aminés notés en rouge sont caractéristiques des GST de la famille *GTE* et les acides aminés surlignés en jaune constituent potentiellement le site catalytique.

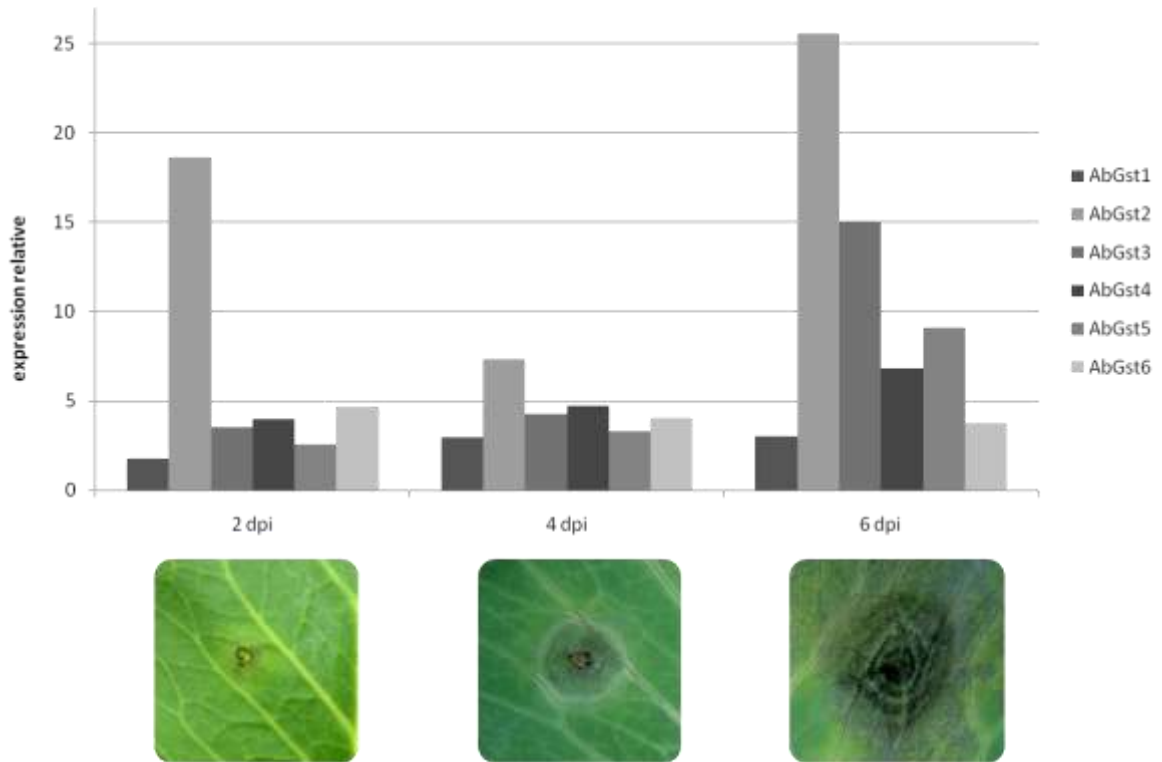
a.



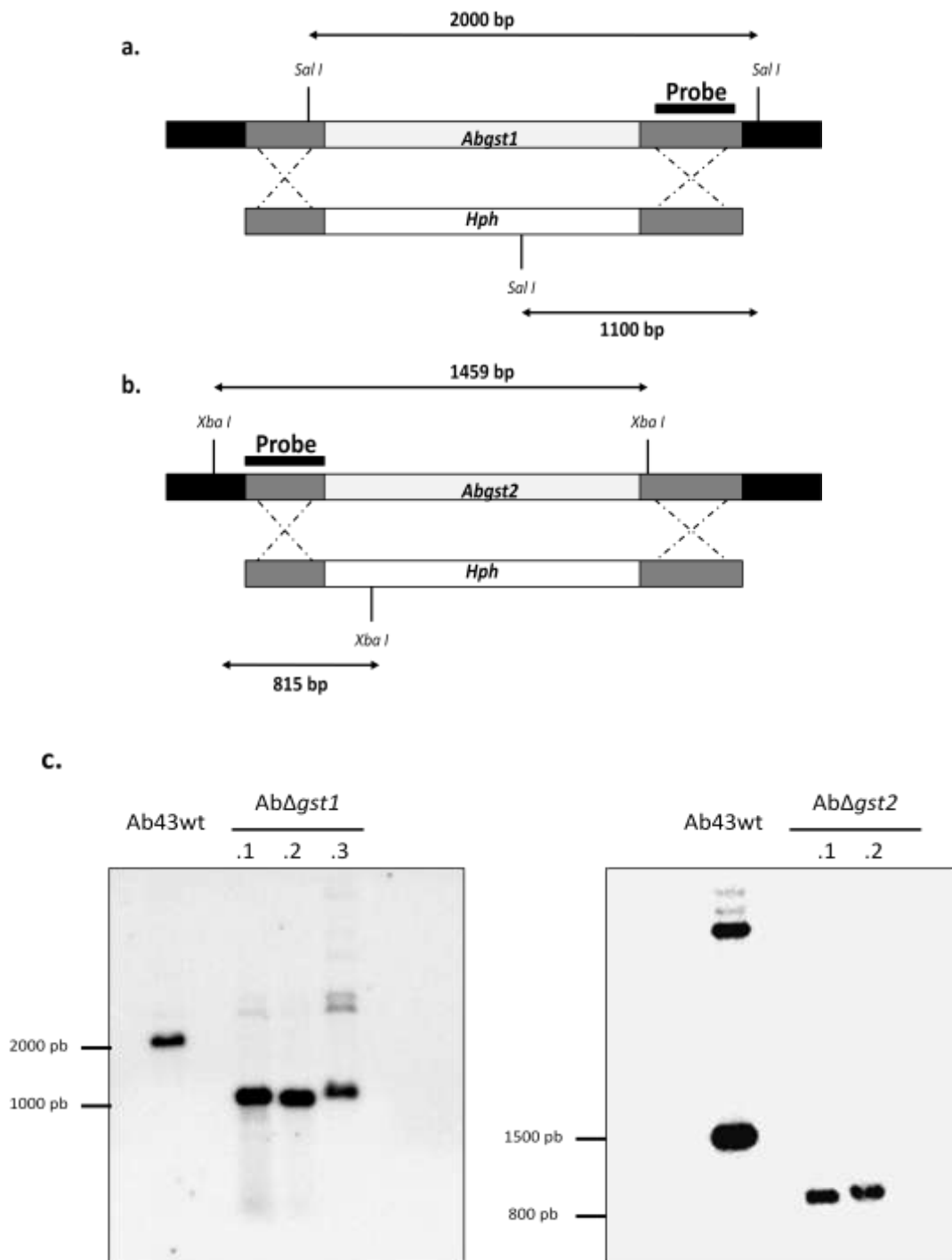
b.



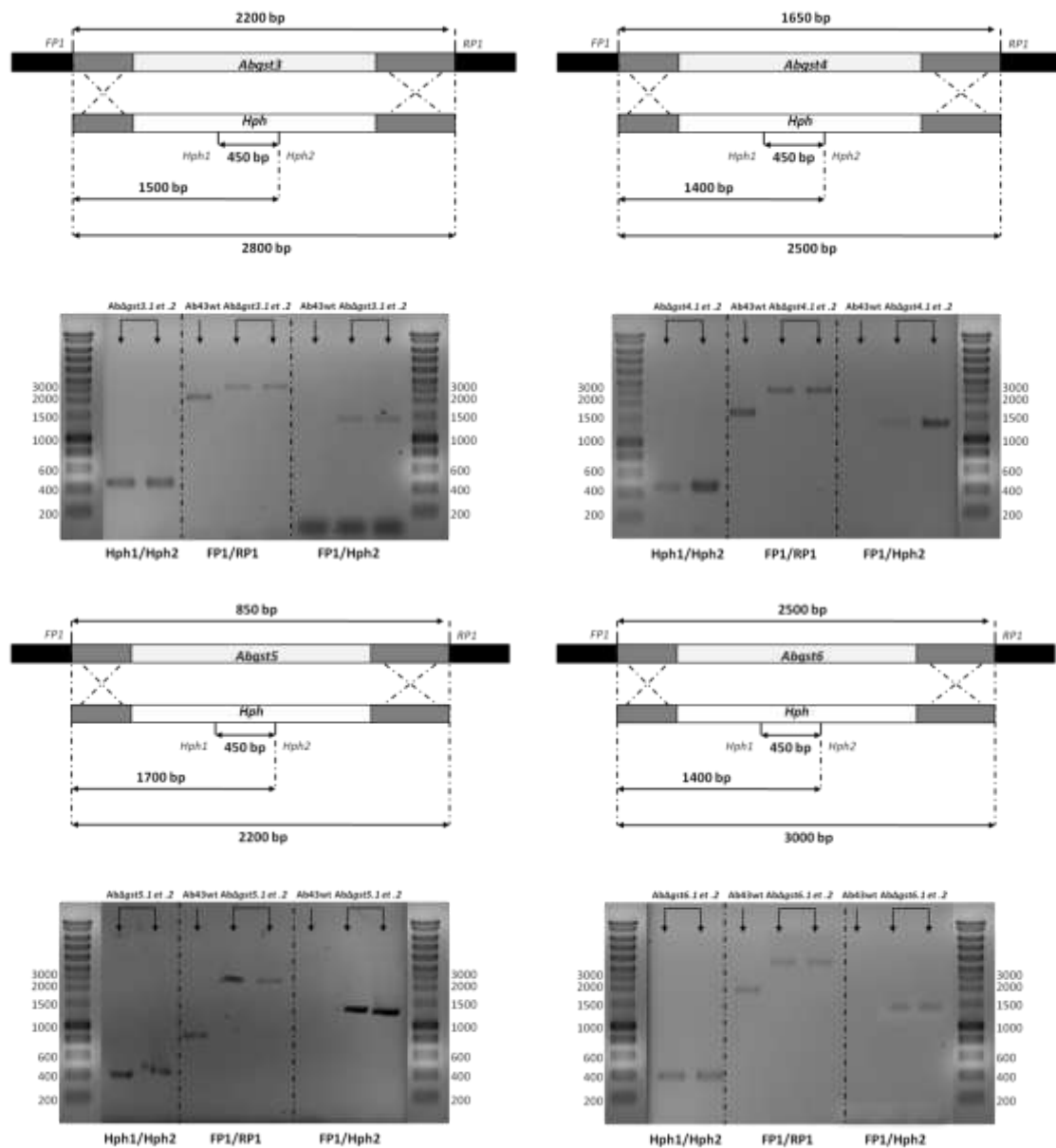
**Figure 71:** Expressions relatives de gènes codant des GST d'*A. brassicicola* au cours d'une cinétique d'exposition aux AI-ITC (2,5 mM) **(a)** ou aux Bz-ITC (300 μM) **(b)**.



**Figure 72:** Expressions relatives de gènes codant des GST d'*A. brassicicola* au cours d'une cinétique d'inoculation sur choux.



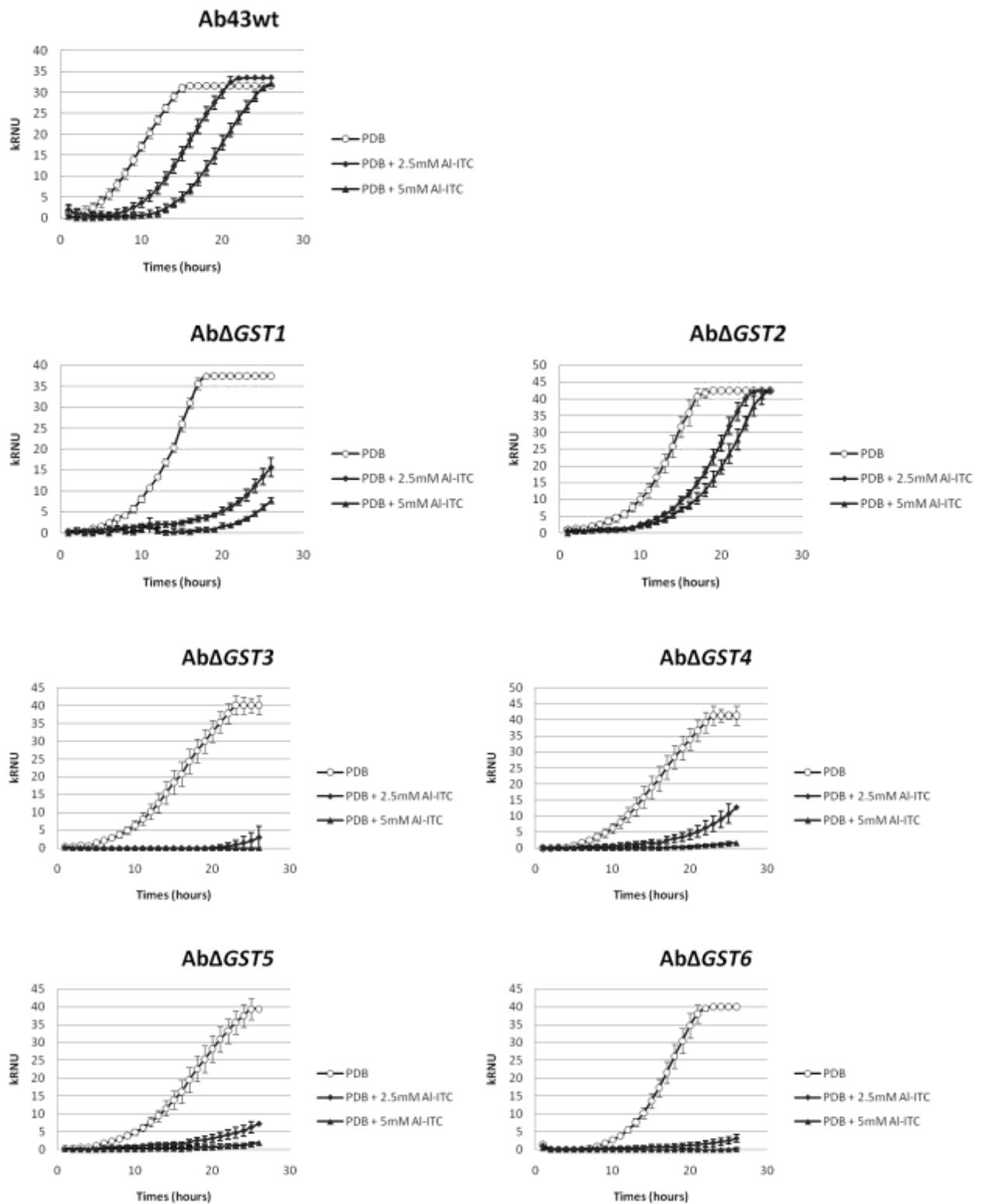
**Figure 73:** Inactivation des gènes *Abgst1* et *Abgst2* par recombinaison homologue. Schémas de la recombinaison homologue entre le génome d'*A.brassicicola* et les cassettes de mutation incluant les sondes spécifiques pour les southern-blot et les sites de restrictions; respectivement pour les disruptions de *Abgst1* avec le gène *Hph* (**a**) et de *Abgst2* avec le gène *Hph* (**b**). (**c**) Résultats d'hybridation Southern à partir d'ADN génomiques du génotype sauvage et des mutants digérés avec *Sal 1* pour *Ab $\Delta$ gst1* ou *Xba 1* pour *Ab $\Delta$ gst2*.



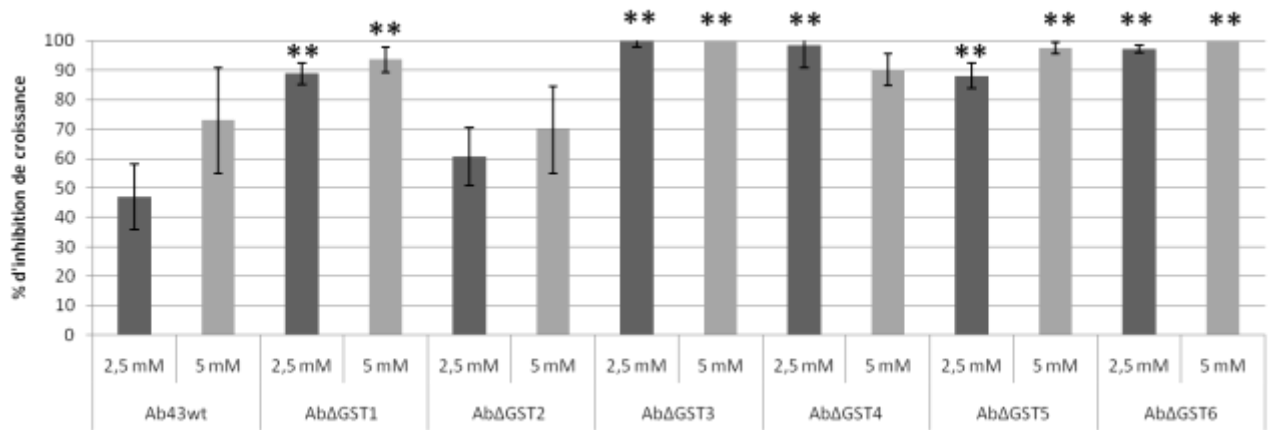
**Figure 74:** Schémas des recombinaisons homologues entre l'ADN génomique d'*A. brassicicola* et les cassettes de mutation ciblant les gènes *Abgst3*, *Abgst4*, *Abgst5* et *Abgst6* avec pour chacun la position des différents couples d'amorces utilisés en PCR conventionnelle et les tailles attendues. Les schémas sont associés aux photographies de gels d'électrophorèse des produits PCR amplifiés pour les matrices Ab43wt (WT) et 2 clones d'AbΔgst<sub>x</sub>.



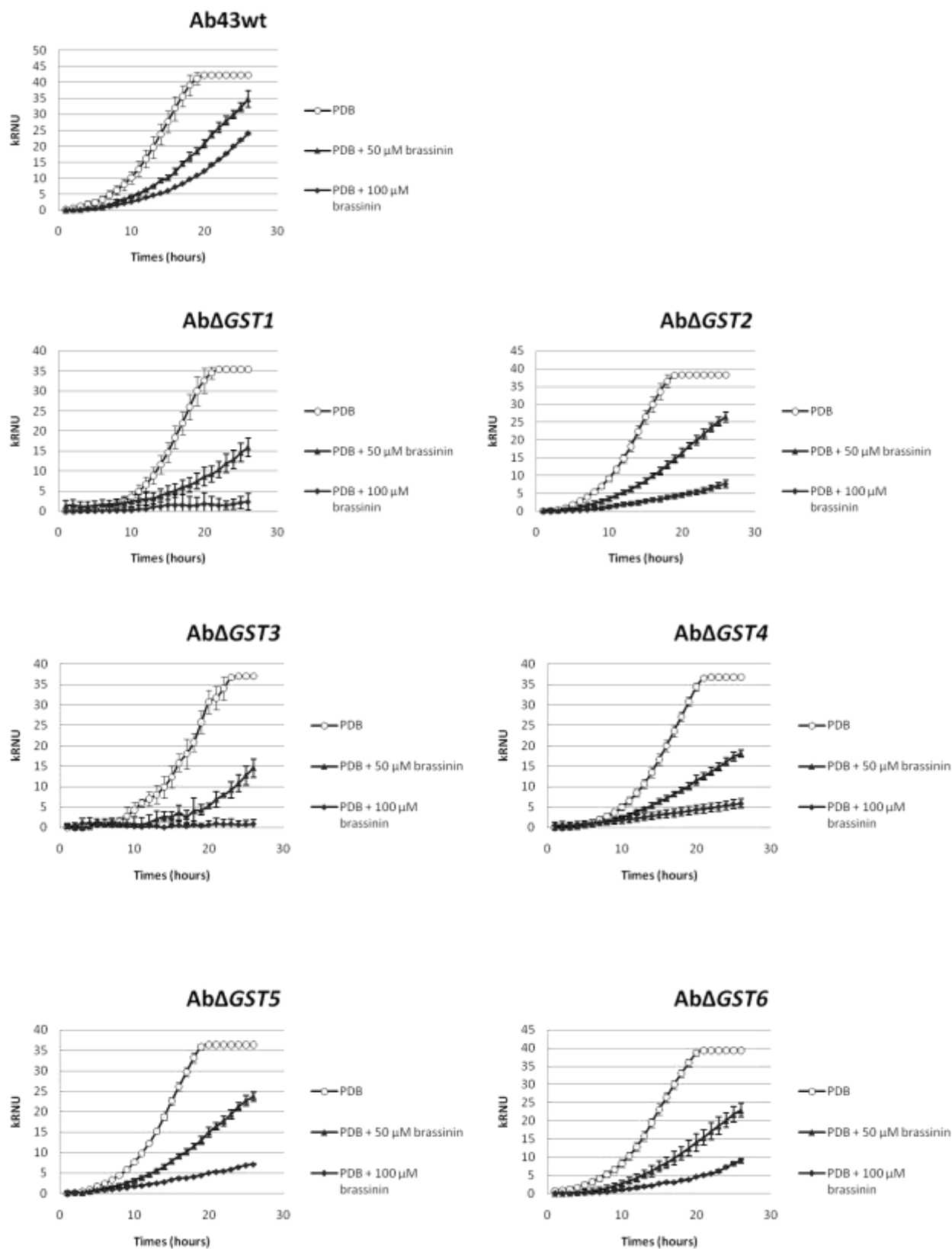
a.



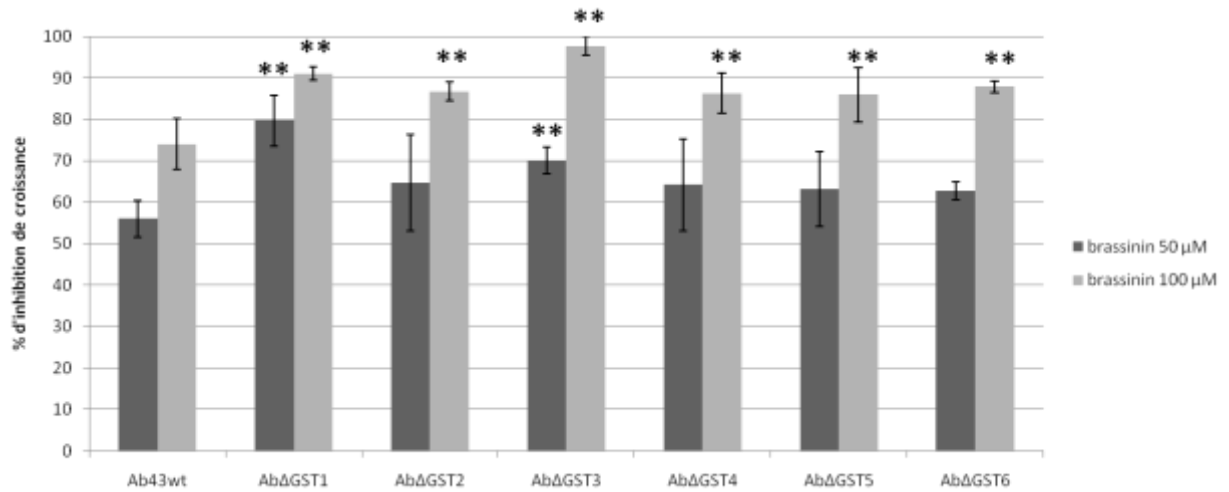
**Figure 75:** Evaluation de la sensibilité des mutants  $Ab\Delta gst_x$  par rapport au génotype sauvage face à un stress généré par les AI-ITC. (a) Représentation graphique de cinétiques de croissance par néphélométrie.



**Figure 75: (b)** Pourcentages d'inhibition de croissance par les AI-ITC calculés à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques (avant saturation d'Ab43wt). (Données statistiquement différentes du génotype sauvage ou au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

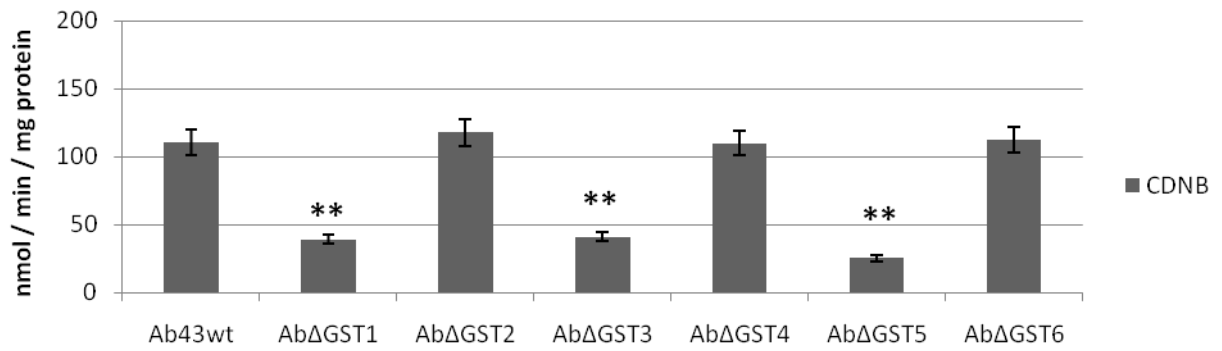


**Figure 76:** Evaluation de la sensibilité des mutants  $Ab\Delta gst_x$  par rapport au génotype sauvage face à un stress généré par la brassinine. (a) Représentation graphique de cinétiques de croissance par néphélométrie.

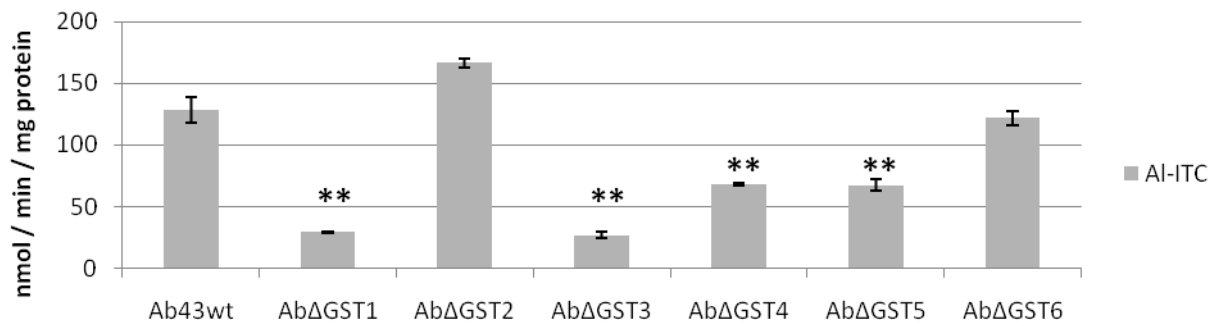


**Figure 76: (b)** Pourcentages d'inhibition de croissance calculés à partir des aires sous les courbes des cinétiques néphélométriques (avant saturation d'Ab43wt). (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).

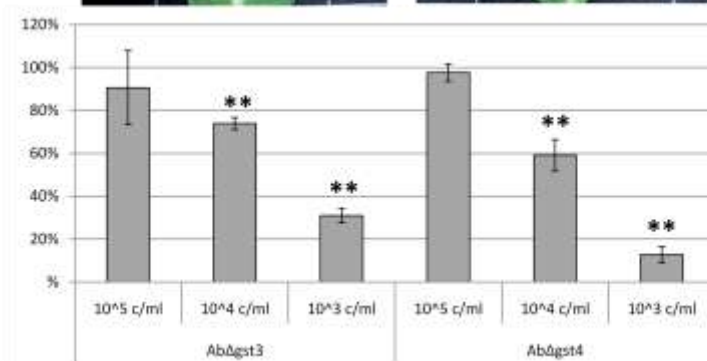
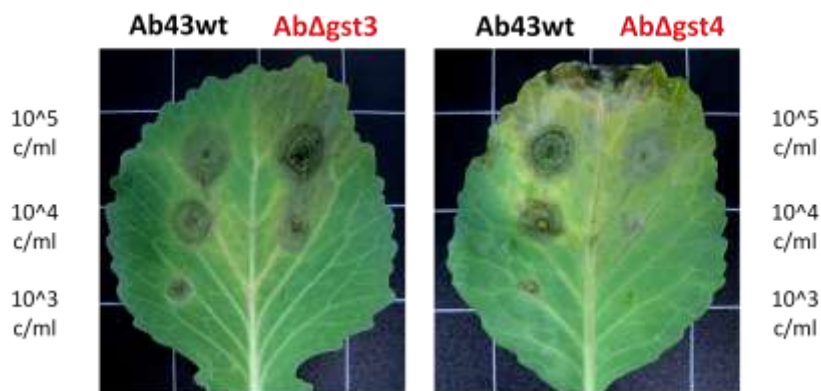
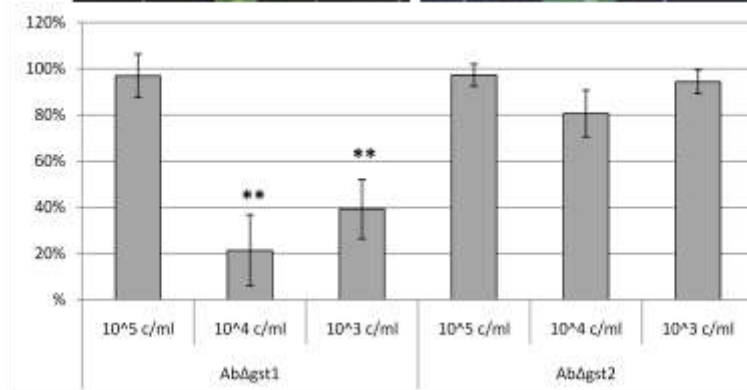
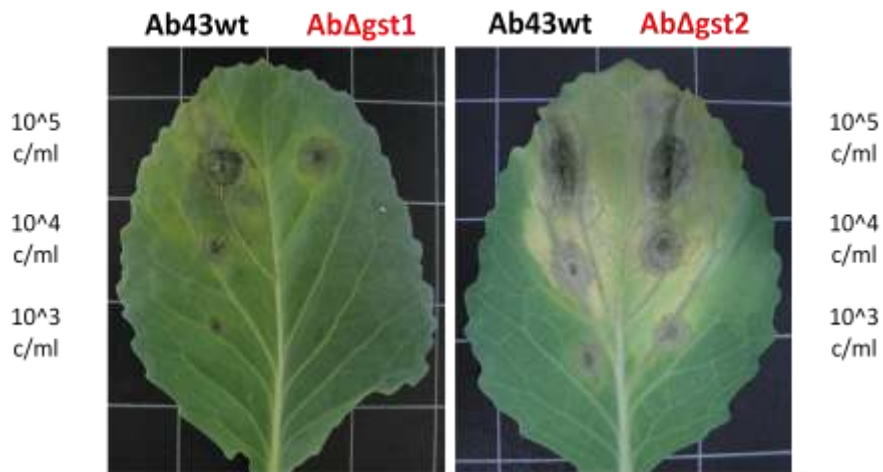
**a.**

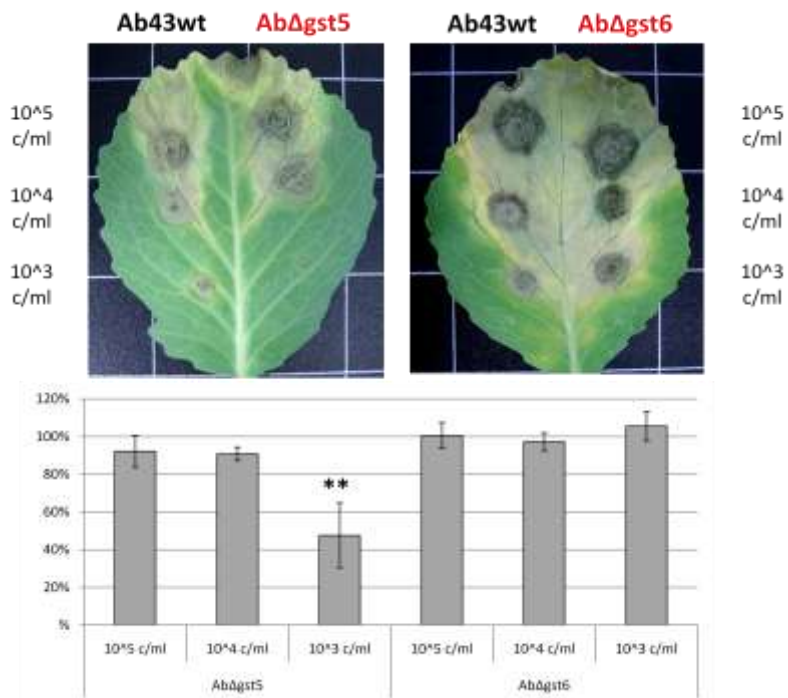


**b.**



**Figure 77:** Activités de conjugaison du Glutathion au CDNB **(a)** ou AI-ITC **(b)** par les GST totales du génotype sauvage Ab43wt et des mutants AbΔ*gst* 1 à 6. (Données statistiquement différentes du génotype sauvage au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student).



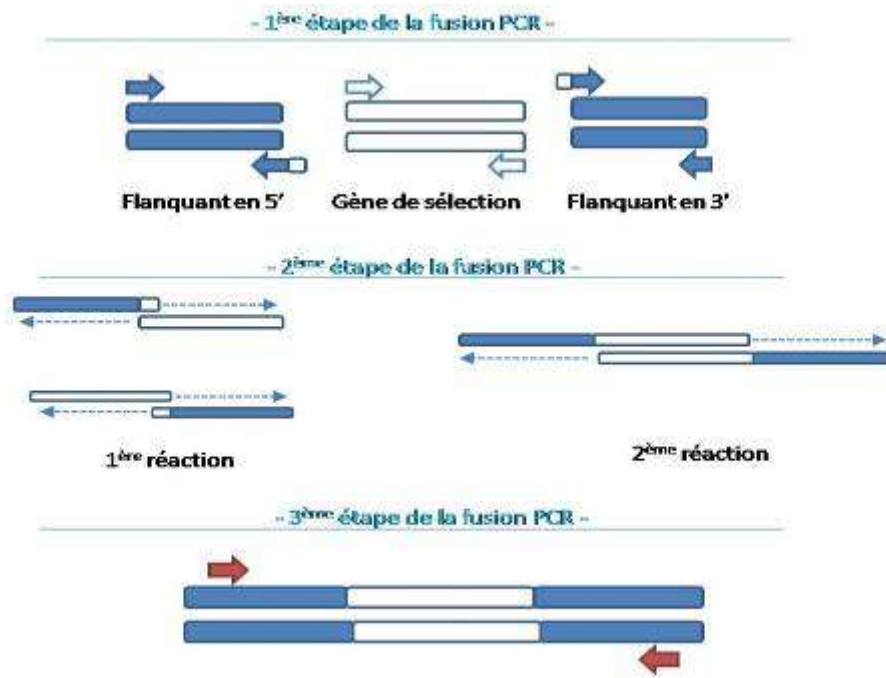


**Figure 78:** Expression du pouvoir pathogène sur chou de différents géotypes d'*A. brassicicola* inoculés à différentes concentrations en conidies (6 jours après inoculation). Données statistiquement différentes de 100% (agressivité du géotype sauvage) au seuil de 1% : \*\* avec un test de Student.

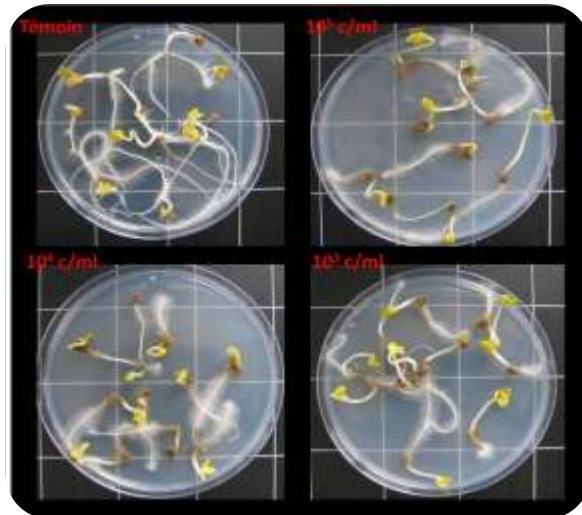
**Tableau 6:** Rappel des principaux résultats. (S : sensible, HS hypersensible).

	<b>Ab43wt</b>	<b>AbΔgst1</b>	<b>AbΔgst2</b>	<b>AbΔgst3</b>	<b>AbΔgst4</b>	<b>AbΔgst5</b>	<b>AbΔgst6</b>	
<b>Classe de la GST disruptée</b>	/	Cluster 1	Cluster 1	Omega	MAPEG	Cluster 2	GTE	
<b>Prédiction de la localisation de la GST disruptée</b>	/	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Sécrétée	Cytoplasme	Mitochondrie ?	
<b>Sensibilité</b>	<b>AI-ITC</b>	Tolérant	S	Tolérant	HS	S	HS	HS
	<b>brassicinine</b>	Tolérant	HS	S	HS	S	S	S
<b>Activité de conjugaison du glutathion par les GST totales</b>	<b>au CDNB</b>	Normale	faible	Normale	faible	Normale	faible	Normale
	<b>au AI-ITC</b>	Normale	très faible	Normale	très faible	faible	faible	Normale
<b>Virulence</b>	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale	
<b>Agressivité</b>	Normale	très faible	Normale	faible	Faible	medium	Normale	

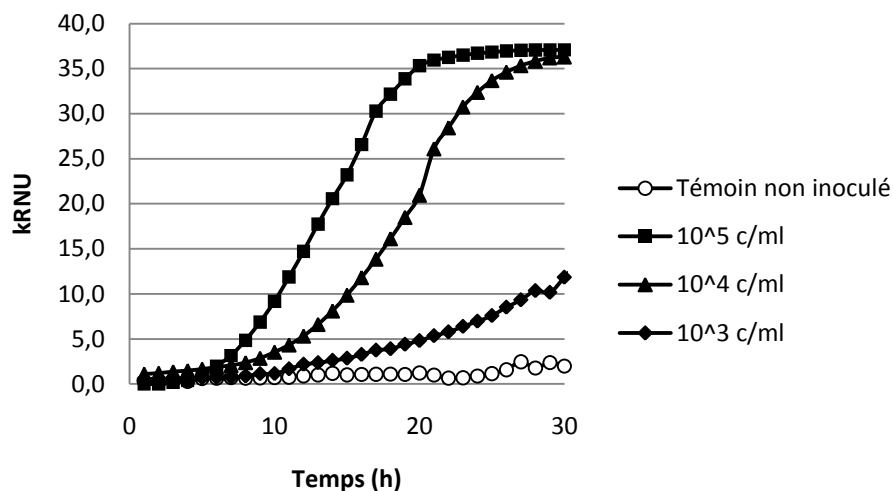




**Figure 79:** Construction de la cassette de mutation par double-joint PCR (Yu et al., 2004).



**Figure 80:** Photographie de graines de radis désinfectées, inoculées *in vitro* avec de l'eau stérile pour le témoin ou avec des suspensions de conidies d'Ab43wt à  $10^3$ ,  $10^4$  ou  $10^5$  conidies / ml, après 3 jours à 24°C et à l'obscurité.



**Figure 81:** Courbes néphélométriques issues de graines de radis désinfectées, inoculées *in vitro* avec de l'eau stérile pour le témoin ou avec des suspensions de conidies d'Ab43wt à  $10^3$ ,  $10^4$  ou  $10^5$  conidies / ml.

**Tableau 7:** moyennes de lag-time des Courbes néphélométriques issues de graines de radis désinfectées, inoculées *in vitro* avec de l'eau stérile pour le témoin ou avec des suspensions de conidies d'Ab43wt à  $10^3$ ,  $10^4$  ou  $10^5$  conidies / ml.

	Témoin	$10^5$ c/ml	$10^4$ c/ml	$10^3$ c/ml
<b>Moyenne de lag-time (h)</b>	<b>&gt; 30</b> +/- 0	<b>5.4</b> +/- 2,2	<b>11</b> +/- 2,4	<b>26,6</b> +/- 4