



HAL
open science

Etude de la relation mycoparasitaire *Trichoderma harzianum* avec *Fusarium solani* chez l'Olivier ; caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez *Trichoderma harzianum*

Maroua Ben Amira

► **To cite this version:**

Maroua Ben Amira. Etude de la relation mycoparasitaire *Trichoderma harzianum* avec *Fusarium solani* chez l'Olivier ; caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez *Trichoderma harzianum*. Génétique des plantes. Université Clermont Auvergne [2017-2020]; Université de Carthage (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018CLFAC009 . tel-01843215

HAL Id: tel-01843215

<https://theses.hal.science/tel-01843215>

Submitted on 18 Jul 2018

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.



Thèse en cotutelle

Présentée à la Faculté des Sciences de Bizerte (Université de Carthage),

En collaboration avec l'Université Clermont Auvergne à Clermont-Ferrand

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE EN BIOLOGIE

Spécialité: Physiologie et génétique moléculaire

Par

M^{me} Maroua BEN AMIRA

Etude de la relation mycoparasitaire *Trichoderma harzianum* avec *Fusarium solani* chez l'Olivier ; Caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez *Trichoderma harzianum*.

Soutenue publiquement le 24 Mai 2018, devant la commission d'examen :

Rapporteurs

Pr BOUSSAÏD Mohamed (INSAT, Tunis, Tunisie)

Pr DELLAGI Alia (AgroParisTech, Paris, France)

Examineurs

Pr GHRABI GAMMAR Zeinab (INAT, Tunis, Tunisie)

Pr DREVET Patricia (UCA, Clermont-Ferrand, France)

Dr CHAAR Hatem (Institut National Agronomique de Tunis, Tunisie)

Pr JULIEN Jean-Louis (UCA, Clermont-Ferrand, France) Directeur de thèse

Invité – Président du jury

Pr LANDOULSI Ahmed (Faculté des sciences de Bizerte, Tunisie)

Membres Invités

Pr KHOUAJA Ali (Institut National Agronomique de Tunis, Tunisie) Directeur de thèse

Dr PUJADE-RENAUD Valérie (CIRAD, Clermont-Ferrand, France)

Dr VENISSE Jean-Stéphane (UCA, Clermont-Ferrand, France)

Je dédie ce travail:

Aux plus chers des êtres, mon père et ma mère,

A ma sœur jumelle,

A mon chéri Salar

Qui m'ont aidés et supportés moralement et matériellement.

A toute ma famille avec toute mon affection.

Remerciements

Cette thèse a été une expérience enrichissante tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel et c'est avec un grand plaisir que je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées lors de mon passage à l'UMR 547 PIAF et qui ont contribué à ce travail.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Jean Louis JULIEN, Professeur des Universités à l'Université Clermont Auvergne, de m'avoir accueillie dans son laboratoire au sein de l'UMR 547 PIAF «Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en Environnement Fluctuant» et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions.

Mes premiers remerciements s'adressent à mes directeurs de thèse : Monsieur Ali KHOUAJA, Professeur des Universités à l'Institut National Agronomique de Tunis, et à Monsieur Jean Louis JULIEN. Je les remercie chaleureusement pour la confiance qu'ils ont toujours témoignée, leur encadrement enrichissant, leur soutien moral et leur disponibilité malgré leurs nombreuses obligations.

Je souhaite remercier profondément Monsieur Jean Stéphane VENISSE, Maître de conférences à l'Université Clermont Auvergne qui a encadré l'ensemble de mes travaux de thèse durant ces 3 années, et Monsieur Hatem CHAAR, Maître de conférences à l'Institut National Agronomique de Tunis, pour ses nombreuses relectures et ses services en statistique. Je remercie Madame Valérie PUJADE-RENAUD pour sa disponibilité.

Je tiens à remercier Monsieur Mohamed BOUSSAÏD et Madame Alia DELLAGI, rapporteurs, ainsi que Mesdames Zeinab GHRABI GAMMAR et Patricia DREVET, examinateurs, d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également Monsieur LANDOULSI Ahmed d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie Messieurs Daniel AUGUIN et Robin MOM pour leur implication dans la modélisation des structures tridimensionnelle des MIP de *Trichoderma*, et de la XIP d'Hévéea.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'implication de Monsieur Mohamed Ali TRIKI, Chercheur à l'Institut d'Olivier de Sfax, qui nous a permis d'accéder aux deux espèces de champignons *Trichoderma harzianum* et *Fusarium solani*. Je le remercie pour son investissement dans ce travail et sa confiance. J'adresse aussi mes remerciements à Madame Nicole BRUNEL et Monsieur Dominique MARCON de m'avoir aidé à effectuer de beaux clichés photographiques de ces champignons.

Mes remerciements chaleureux s'adressent à tous les membres de l'UMR 547 PIAF. Je remercie Pascale GOUPIL, Gérard LEDOIGT, David LOPEZ, Gilles PETEL, Philippe LABEL pour leur bonne humeur quotidienne et les discussions animées à chaque pause café.

Je remercie amicalement Céline SAC, ma voisine de bureau, pour ses conseils et disponibilités. Un grand merci à Sylvaine LABERNIA de m'avoir appris à broyer le matériel végétal et ses nombreux conseils en biologie moléculaire. Enfin, un grand merci à Norbert FRIZOT, mon sauveur de nombreuses pannes informatiques.

Une grande pensée pour les thésards de l'UMR 547 PIAF actuels et de l'époque: Marie, Jeanne, Kévin, Juliette, Lise. Ainsi que les thésardes de l'UMR 1095 GDEC, Oussama et Claire. Je les remercie pour les moments de joie et de détente partagés.

Mes derniers remerciements s'adressent à tous ceux qui forment mon "cocon" familial. Je pense en premier à mes parents sans qui l'enfant que j'étais ne serait pas devenu la femme que je suis. C'est avec émotion qu'à mon tour je leur dévoile le fruit de mes efforts. J'espère être à la hauteur de leur fierté inconditionnelle. Une pensée profonde va directement vers mon père : "le chemin est long, mais je sais que tu es là" et vers ma mère qui m'a encouragé jusqu'au bout. Je n'oublierai jamais les efforts et la fatigue qu'ils ont passé par. Je les remercie de m'avoir donné un environnement (familial et matériel) idéal dans mon enfance et de m'avoir enseigné les valeurs essentielles (humilité, honnêteté et passion) avec lesquelles

j'ai toujours essayé d'aborder mon travail scientifique. Merci Maman et Papa d'avoir su me comprendre dans les moments les plus difficiles et de m'avoir toujours fait confiance. Je leur serai éternellement reconnaissante.

Je remercie tout particulièrement mon chéri Salar qui m'a encouragé dans ma vie et a su être présent pour me soutenir dans mes difficultés.

Mes derniers remerciements et non les moindres s'adressent à ma sœur qui m'a soutenu dans tous les domaines. Elle était là pour me protéger et me conseiller. Elle est la clef de ma réussite. Sans elle à mes côtés, cette réalisation n'aurait pas la même saveur.

Sommaire

Chapitre 1 INTRODUCTION GENERALE	1
1 - L'olivier	3
2 - L'oléiculture en Tunisie	3
3 - Programmes génétiques chez l'olivier	7
4 - Le phénomène de dépérissement chez l'olivier	7
5 - Le genre <i>Fusarium</i>	11
5.1 - Concepts généraux	11
5.2 - <i>Fusarium solani</i>	11
5.3 - Morphologie des <i>Fusarium</i>	13
5.4 - Les symptômes de <i>Fusarium</i>	15
5.5 - Impacts agro-économiques et sociétaux	15
5.6 - Les toxines de <i>Fusarium</i>	17
6 - Les moyens de lutte requis dans le contrôle des agents du dépérissement	18
6.1 - La lutte culturale	19
6.2 - La lutte génétique	19
6.3 - Le greffage	19
6.4 - La solarisation	19
6.5 - La lutte chimique	20
6.6 - La lutte biologique	20
6.7 - Le mycoparasitisme	23
6.8 - Les interactions plantes/pathogènes – généralités	26
7 - Les microorganismes bénéfiques, cas de <i>Trichoderma</i>	28
7.1 - Le genre <i>Trichoderma</i> , concepts généraux	28
7.2 - <i>Trichoderma</i> comme agent de lutte contre les phytopathogènes	30
7.2.1 - Actions antagonistes directes déployées par <i>Trichoderma</i>	30
7.2.2 - Actions antagonistes indirectes, déployées par la plante sous la gouverne de <i>Trichoderma</i>	34
7.3 - Exploration de la relation pathosystémique et tripartite impliquant <i>Trichoderma</i> sous le prisme nutritionnel	35
8 - Les Major Intrinsic Protein (MIP)	37
8.1 - Concepts généraux	37
8.2 - Les MIP fongiques	37
8.3 - MIP et relation parasitaire	40
8.4 - Structure protéique, et détail de quelques points de régulation	41
9 – Conclusion	42
Chapitre 2 OBJECTIFS et DEMARCHE	43
Chapitre 3 QUESTION 1	46
<i>T. harzianum a-t-il un impact sur la virulence de F. solani chez l'olivier ?</i>	
Chapitre 4 QUESTION 2	58
<i>Les perméases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de T. harzianum ?</i>	
Chapitre 5 CONCLUSION et PERSPECTIVES	67
Chapitre 6 LISTES DES PUBLICATIONS et ACTIVITES SCIENTIFIQUES	75
Chapitre 7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	85

Abréviations

AIA: Acide Indole Acétique
AQGP: AQuaGlycéroPorines
AQP: Aquaporine
Ar/R: motif aromatique/Arginine
BCA: Biological Control Agents
CWDEs: Cell Wall Degrading Enzymes
DON: DéOxyNivalénol
ET: EThylène
Fso14: *Fusarium solani*, souche Fso14
FSSC: Complexe d'espèces de *Fusarium solani*
F. solani f. sp. : *Fusarium solani formae specialis*
GLP: glycerol-uptake facilitators
HR: Réponse hypersensible (Hypersensitive Reaction)
ITS: Internal Transcribed Spacer
JA: Acide Jasmonique
JGI: *Joint Genome Institute*
LAR: Résistance induite localement (Local Acquired Resistance)
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MFs: Major Facilitator superfamily
MIP: Major Intrinsic Proteins
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NPA : motif Asparagine-Proline-Alanine
6PAP: 6 Pentyl- α -Pyrone
PDA : Potato Dextrose Agar
PGPM: Plant Growth Promoting Microorganism
PGP-F: Plant Growth Promoting Fungi
PGP-Y: Plant Growth Promoting Yeast
PGP-B: Plant Growth Promoting Bacteria
PGP-R: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PR: Pathogenesis Related proteins
OILB: Organisation Internationale de la Lute Biologique
ROS: Reactive Oxygen Species
SAR: Résistance systemique aqoise (Systemic Acquired Resistance)
SIR: Systemic Induced Resistance
Ths97: *Trichoderma harzianum*, souche Ths97
XIP: X-Intrinsic Proteins
ZON: Zéaralénol

Liste des figures

figure 1	(A) Planche d'illustration d' <i>Olea europaea</i> . (B) Classification phylogénétique d' <i>Olea europaea</i> .	2
figure 2	Sites et répartition géographique des variétés agronomiques autochtones et des types locaux d'olivier en Tunisie (Trigui et al., 2002)	4
figure 3	Les phases végétatives chez l'olivier au cours d'une année	4
figure 4	Répartition du phénomène de dépérissement de l'olivier en Tunisie	6
figure 5	Symptômes de dépérissement (fusariose) sur oliviers et différents organes	8
figure 6	Approche systématique pour des origines de dépérissement (Laverdière et Lacroix, 2008).	8
figure 7	Classification taxonomique de <i>Fusarium solani</i>	10
figure 8	Aspect macroscopique de <i>Fusarium solani</i>	12
figure 9	Structure microscopique de <i>Fusarium solani</i>	12
figure 10	Cycle de la maladie du flétrissement causé par <i>Fusarium solani</i>	14
figure 11	Structure moléculaire du Déoxynivalénol (DON) et du Zéaralénone (ZON).	16
figure 12	Aspect macroscopique de <i>Trichoderma harzianum</i>	27
figure 13	Structure microscopique de <i>Trichoderma</i> sp.	27
figure 14	Mécanismes de mycoparasitisme exercés par les souches de <i>Trichoderma</i>	29
figure 15	Mécanismes d'induction de la résistance systémique au niveau du système racinaire par <i>Trichoderma</i>	31
figure 16	Représentation schématique des événements physiologiques chez la plante induits par les voies de signalisation déclenchées par <i>Trichoderma</i>	33
figure 17	Effets de la production par <i>Trichoderma</i> d'ACC désaminase (ACCD) et d'acide indole-3-acétique (AIA) sur la plante.	33
figure 18	Classification phylogénétique des aquaporines	36
figure 19	Relation phylogénétique des aquaporines fongiques	36
figure 20	Modèle du sablier des aquaporines	39
figure 21	Schéma Tripartite Olivier - <i>Trichoderma harzianum</i> - <i>Fusarium solani</i>	70

Résumé

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes a indéniablement un potentiel de développement considérable. Dans un contexte multidisciplinaire et fondamental de physiopathologie moléculaire et répondant à d'éminents enjeux appliqués et attendus par les acteurs de la profession oléicole et les consommateurs, nous nous sommes projetés dans l'étude des propriétés intrinsèques d'un agent de biocontrôle fongique, *Trichoderma harzianum* (souche *Ths97*) contre l'agent de la fusariose *Fusarium solani* (souche *Fso14*), qui sévit sévèrement sur une culture pérenne majeure pour la Tunisie, l'oléiculture. Deux axes de recherche ont été menés. Dans le premier axe, nous avons démontré que *Ths97* est un agent de biocontrôle efficace contre la virulence de *F. solani Fso14*. Cette capacité s'accompagne d'une accumulation des défenses chez le partenaire végétal, des accumulations qui sont d'autant plus fortes quand l'agent bénéfique est en présence du pathogène (événements de priming). De même, des tests *in vitro* montrent que *Ths97* développe des activités mycoparasites envers *F. solani Fso14*, en émettant des structures d'infection classiques tels des enroulements et accolements d'hyphes, des appressoria et des papilles. Quant au second axe d'étude, nous avons étudié la superfamille des perméases Major Intrinsic Proteins (MIP) dans le genre *Trichoderma*. Cette famille multigénique n'a jamais été étudiée chez un agent fongique hyperparasite. Sept membres MIP sont présents chez *T. harzianum*, et se classent en 3 sous-groupes, les AQP, les AQGP et les XIP. La modélisation des structures tridimensionnelles et les fonctions putatives de transport pour l'eau et quelques polyols ont été étudiées. Enfin, leurs patrons transcriptionnels ont été suivis chez *Ths97 in planta* en situation d'antagonisme et *in vitro* en situation de parasitisme vis-à-vis de *Fso14*, et montrent que 4 MIP sont exprimées et régulées différenciellement selon que *Ths97* est au contact de *Fso14* ou pas. Nos travaux ont donc mis en lumière que *Ths97* doit être considéré comme un agent biofongicide et biostimulateur de défenses végétales, puis que les MIP seraient impliquées dans les relations trophiques que met en place *T. harzianum* avec son environnement. Ces données devraient intégrer le développement de procédés plus efficaces et/ou plus durables pour la protection des cultures d'oliviers en Tunisie ainsi qu'à travers le monde.

Abstract

Biological disease control through the use of microorganisms has a great potential for future use in integrated pest management. In a multidisciplinary and fundamental context of molecular physio-phytopathology and to provide solutions for the actors in the olive profession and the consumers, we have been studying the activity of a fungal biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* (strain *Ths97*) against the olive tree pathogen *Fusarium solani* (strain *Fso14*), which causes major problems for olive production in Tunisia and elsewhere. The project consists of two parts. In the first part, we have demonstrated that *Ths97* is a biocontrol agent effective against the *F. solani Fso14* pathogen. Induction of plant defence responses by *Ths97* was shown to be partly responsible for the biocontrol effect. *In vitro* tests further showed that *Ths97* develops mycoparasitic activities towards *F. solani Fso14*, by forming infection structures such as hyphae windings and wedges, appressoria and papillae. In the second part of the study, we investigated the Major Intrinsic Proteins (MIP) superfamily in the *Trichoderma* genus. This multigenic family has never been investigated in a hyperparasitic fungal species. Seven MIP members are present in *T. harzianum*, and are classified into 3 subgroups: AQP, AQGP and XIP. Their three-dimensional structures and their putative involvement in transport of water and certain polyols have been examined. Finally, their transcription profiles were monitored in *Ths97 in planta* in antagonistic situations and *in vitro* in a parasitic situation with *Fso14* and show that 4 MIP are expressed and regulated differentially during the interaction. Our work has shown that *Ths97* must be considered as a biological control agent and biostimulator of plant defences, and that MIPs are involved in the trophic relationships between *T. harzianum* and the environment. These data contributes to the further development of *T. harzianum* as an efficient biocontrol agent for sustainable protection of olive trees in Tunisia and around the world.

ملخص

إن مكافحة الأمراض البيولوجية من خلال استخدام الكائنات الحية الدقيقة لديها إمكانات كبيرة لاستخدامها في المستقبل في الإدارة المتكاملة للآفات. في سياق متعدد التخصصات والأساسي من الجزيئية فيزيولوجيا النبات، وتوفير حلول للجهات العاملة في مهنة الزيتون والمستهلكين، ونحن ندرس نشاط عامل مكافحة الحيوية الفطرية، تريتشوديرما هارزيانوم (سلالة Ths97) ضد المرض شجرة الزيتون فوزريوم سولاني (سلالة Fso14)، مما يسبب مشاكل كبيرة لإنتاج الزيتون بتونس وأماكن أخرى. ويتألف المشروع من جزأين. في الجزء الأول، أثبتنا أن *Ths97* هو عامل مكافحة الحيوية فعال ضد المرض فوزريوم سولاني *Fso14*. وقد تبين أن تحريض استجابات الدفاع النباتي بواسطة *Ths97* مسؤول جزئيا عن تأثير مكافحة الحيوية. وأظهرت الاختبارات في المختبر أيضا أن *Ths97* تطور الأنشطة ميكوباراسيتيك نحو فوزريوم سولاني *Fso14*، من خلال تشكيل هياكل العدوى مثل اللفائف الخيطية والأوتاد، أبريسوريا والحليمات. في الجزء الثاني من الدراسة، قمنا بالتحقيق في البروتينات الرئيسية الجوهرية (ميب) في جنس تريتشوديرما. لم يتم التحقيق في هذه العائلة متعددة الجنسيات في أنواع فطرية طفيليات. ويوجد سبعة أعضاء في برنامج ميب في تريكدوما هارزيانوم، ويصنفون إلى 3 مجموعات فرعية: أقبس، أقبس و زيبس. وقد تم فحص هياكلها الثلاثية الأبعاد ومشاركتها المفترضة في نقل المياه وبعض البولولات. وأخيرا، تم رصد ملامح النسخ في *Ths97* في بلانتا في حالات معادية وفي المختبر في حالة طفيلية مع *Fso14* وتبين أن 4 ميبس يتم التعبير عنها وتنظيمها بشكل تفاضلي خلال التفاعل. وقد أظهرت أعمالنا أن *Ths97* يجب أن يعتبر عامل مكافحة البيولوجية وبيوستيمولاتور من الدفاعات النباتية، وأن ميبس تشارك في العلاقات الغذائية بين تريكدوما هارزيانوم والبيئة. وتساهم هذه البيانات في زيادة تطوير تريكدوما هارزيانوم كعامل تحكم بيولوجي فعال من أجل الحماية المستدامة لأشجار الزيتون في تونس وحول العالم.

Préambule - Contexte structurel de la thèse

La présence d'espèces pathogènes de *Fusarium* au sein de cultures a des répercussions très larges, impactant en premier lieu la pérennité de la production, et insidieusement, un tissu urbain déjà très fragilisé à travers le monde. De plus, la santé des consommateurs n'est pas totalement garantie. La lutte contre *Fusarium* passe majoritairement par l'emploi de pesticides dont les impacts négatifs sur nos environnements *lato sensu* (i.e. naturel comme alimentaire) sont indiscutables. Il est opportun, mais surtout urgent, de chercher à optimiser des mesures de lutte plus respectueuses comme par exemple la lutte biologique (ou biocontrôle). C'est dans ce cadre que ce sujet s'intègre, afin d'étudier le pouvoir de contrôle qu'exercerait "*Trichoderma*", un champignon antagoniste, envers l'agent de la fusariose chez l'olivier, *Fusarium solani*.

L'agriculture vit une profonde mutation à l'échelle internationale, voire même semble vivre une nouvelle révolution. Après la très large dissémination d'une nouvelle génération de cultivars de très haute valeur agronomique secondée par la généralisation de l'utilisation d'engrais chimiques et de produits phytosanitaires qui ont permis des augmentations considérables des rendements au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, l'essor des biotechnologies et de nouvelles techniques culturales imprégnées de réflexions économiques, sociales et environnementales plus respectueuses et humanistes semble se dessiner. A l'instar des inquiétudes exprimées par la population mondiale à la sortie de la seconde guerre mondiale et qui a fondé les concepts majeurs de la dernière révolution verte, le défi actuel à relever consiste à bâtir les nouvelles fondations d'une agriculture moderne destinée à nourrir d'ici 2050 entre 9 et 10 milliards d'êtres humains. Une des préoccupations majeures reste toujours l'augmentation des capacités de production des aliments, dont ceux issus des végétaux. Mais le véritable défi ne se cantonnera pas à ce simple prisme productiviste. Il sera socialement relevé si les efforts consentis intègrent les préoccupations ciblant la préservation de l'environnement.

Les plantes, dans leur grande majorité, sont résistantes à la plupart des agents infectieux et ravageurs. Cette résistance fondamentale vis-à-vis d'agents phytopathogènes avirulents se manifeste par la mise en place de mécanismes de résistances constitutives, qui, ultimement, peuvent être spatio-temporellement sur-accumulés car inductibles et modulables. Les mécanismes moléculaires sous-jacents, d'une grande diversité dans le règne végétal mais qui restent essentiellement de type morpho-anatomiques et chimiques, constituent l'immunité fondamentale de l'organisme. En dépit de ces mécanismes, l'infestation d'une plante peut se manifester par l'apparition de symptômes morbides évolutifs qui traduisent l'installation et le développement de l'agent phytopathogène virulent. Cette relation parasitaire, dont la finalité est avant tout l'établissement d'un réseau trophique, reste relativement contenue dans la nature. Toutefois, elle devient extrêmement critique pour de nombreuses espèces végétales, le plus souvent manipulées génétiquement (ie sélectionnées) par l'Homme pour des intérêts agronomiques. En effet, en comparaison avec les performances des espèces originelles, les événements de sélections ont abouti paradoxalement à une érosion génétique des espèces domestiquées qui se traduit par une diminution substantielle de leur robustesse globale de résistance. Par conséquent, leurs rendements sont généralement d'autant plus impactés si aucun recours approprié n'est appliqué. La protection des productions végétales est actuellement encore largement assurée par l'application de produits phytosanitaires de synthèse chimique.

Ce versant de l'agronomie s'inscrit nettement dans cette dynamique de transition. Et l'intégration progressive de nouvelles pratiques alternatives à l'utilisation de "pesticides" et tenant compte non seulement de la dimension environnementale mais aussi de la dimension socio-économique, est en pleine actualité. Parmi les moyens de protection des végétaux, la lutte biologique ou biocontrôle par utilisation de micro-organismes ou de produits dérivés, est une orientation pertinente à suivre pour minimiser la pollution et les nuisances associées à l'utilisation de produits chimiques de synthèse et pour réduire très fortement leur impact négatif sur l'environnement.

Le concept de biocontrôle est devenu un enjeu technologique, économique et politique important pour développer une agriculture durable à un moindre coût écologique, et par effet induit, socialement supportable. A différents endroits du globe comme en France (plan Ecophyto 2018), aux Pays-Bas (Multi-Year Crop Protection Plan depuis les années 1990), au Canada ou au Japon, des mesures très fortes sont déployées et illustrent, sans équivoque, une prise de conscience majeure face à l'accumulation de résidus toxiques dans l'environnement et dans les maillons de la chaîne alimentaire. Mais paradoxalement, même si ces plans préconisent des réductions de l'ordre de 50 % de l'utilisation de pesticides à des horizons soit déjà atteints soit relativement très proches selon les formulations, les pesticides restent encore trop présents, mais surtout, ils laissent entrevoir le manque d'alternatives efficaces pour réduire la dépendance du secteur agricole envers les pesticides.

Les oliveraies n'échappent en rien à ces problématiques biologiques et structurales, cependant les forêts oléicoles de nombreux pays sont fragilisées par le développement inquiétant de plusieurs maladies cryptogamiques comme la fusariose. Les champignons phytopathogènes incriminés dans cette maladie appartiennent au genre *Fusarium*. Leur infection provoque des symptômes de dépérissements lents ou d'apoplexies. Déjà très répandue dans tous les pays oléicoles du bassin méditerranéen, cette maladie menace sérieusement la pérennité de nombreuses oliveraies non seulement dans tout le pourtour du bassin méditerranéen (dont la Tunisie) mais aussi au niveau mondial. Actuellement, il n'existe pas vraiment de moyen de lutte à grande échelle aussi efficace que l'application de fongicides comme l'hymexanol ou la carbendazime. Le secteur de l'huile d'olive en Tunisie est soumis à d'importants efforts de restructuration qui s'inscrivent dans une démarche volontariste d'amélioration de la qualité de ses huiles ainsi que dans une réflexion sincère de double préservation, à savoir la santé des producteurs et des consommateurs et le respect de l'environnement. Afin de répondre à ce double objectif ambitieux, la voie de lutte recourant au biocontrôle est envisagée. Ce biocontrôle se concrétise par l'exploitation d'organismes antagonistes, comme par exemple certaines espèces de champignons appartenant au genre *Trichoderma*. De plus, les effets myco-protecteurs assurés par ce champignon seraient doublés d'une dynamisation de croissance des plantes placées sous ce même biocontrôle. Mais aujourd'hui encore, le biocontrôle de bon nombre de maladies cryptogamiques sur l'olivier n'en est qu'à ses balbutiements.

Dans ce contexte, il semble donc essentiel d'approfondir les connaissances sur le biocontrôle sur l'olivier pour améliorer son utilisation et son efficacité vis-à-vis de désordres pathologiques, et ce tout en préservant l'environnement. Mon projet de thèse a pour objectif général d'étudier les capacités d'un de ces micro-organismes, un oomycète nommé *Trichoderma harzianum*, utilisé depuis plusieurs décennies comme agent de biocontrôle sur différentes espèces cultivées. Dans un premier temps, il s'agira d'estimer son aptitude à protéger des plants d'olivier contre des infestations de *Fusarium solani*, et d'identifier

quelques mécanismes antagonistes sous-jacents potentiels. Dans un second temps, nous étudierons l'interaction qu'il établit avec son champignon hôte mais sous le prisme trophique, c'est-à-dire en explorant expressément l'implication de perméases *a priori* impliquées dans l'échange d'éléments de matière (eau, glycérol etc) nécessaires à la vie de l'hyperparasite.

Enfin, cette thèse est le fruit d'un travail réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre le laboratoire des ressources sylvo-pastorales de Tabarka, Faculté des Sciences de Bizerte, et l'UMR 547 PIAF (Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en Environnement Fluctuant) localisée à l'Université Clermont Auvergne à Clermont-Ferrand. Elle a été encadrée par Pr. Ali KHOUAJA (Institut National Agronomique de Tunis) et Pr. Jean Louis JULIEN (UMR PIAF, Clermont Auvergne de Clermont Ferrand). Mon co-encadrement a été assuré par Dr Jean-Stéphane VENISSE (UMR PIAF), Dr Valérie PUJADE-RENAUD (CIRAD, UMR PIAF) et Dr Hatem CHAAR (Institut National Agronomique de Tunis). Cette thèse a bénéficié d'un soutien financier supporté par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique en Tunisie. De même, il a été soutenu par le programme PHC «Utique» établi par le Comité Mixte de Coopération Universitaire (CMCU) (grant 34861PF), dont le financement émane des Ministères des Affaires Etrangères de Tunisie, et de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de France.

De la légende à l'histoire

Symbole de paix et d'éternité, l'olivier est aussi la représentation symbolique parfaite de la Méditerranée: à la fois chaleureux et lumineux, sauvage et majestueux, courageux et nourricier.



Une légende grecque nous rapporte la querelle d'Athéna, déesse de la Sagesse avec Poséïdon, Dieu de la Mer, à propos de la protection d'une ville nouvelle.

Pour les départager, Zeus, Dieu des Dieux, leur proposa de faire un don à l'Humanité.

Poséïdon brandit un trident et fit jaillir d'un rocher un cheval pouvant porter cavaliers et armes et traîner des chars remportant les batailles.

Athéna se pencha alors sur un morceau de terre. Son regard fit naître un arbre nourrissant et apte à soigner les plaies et les rhumes. De plus, cet arbre présente la faculté d'immortalité. Cet arbre est l'olivier.

Cette essence végétale, véritable don des dieux, fut déclarée «le don le plus utile à l'humanité». Athéna obtint alors la protection de la ville qui porte toujours son nom, Athènes.

1

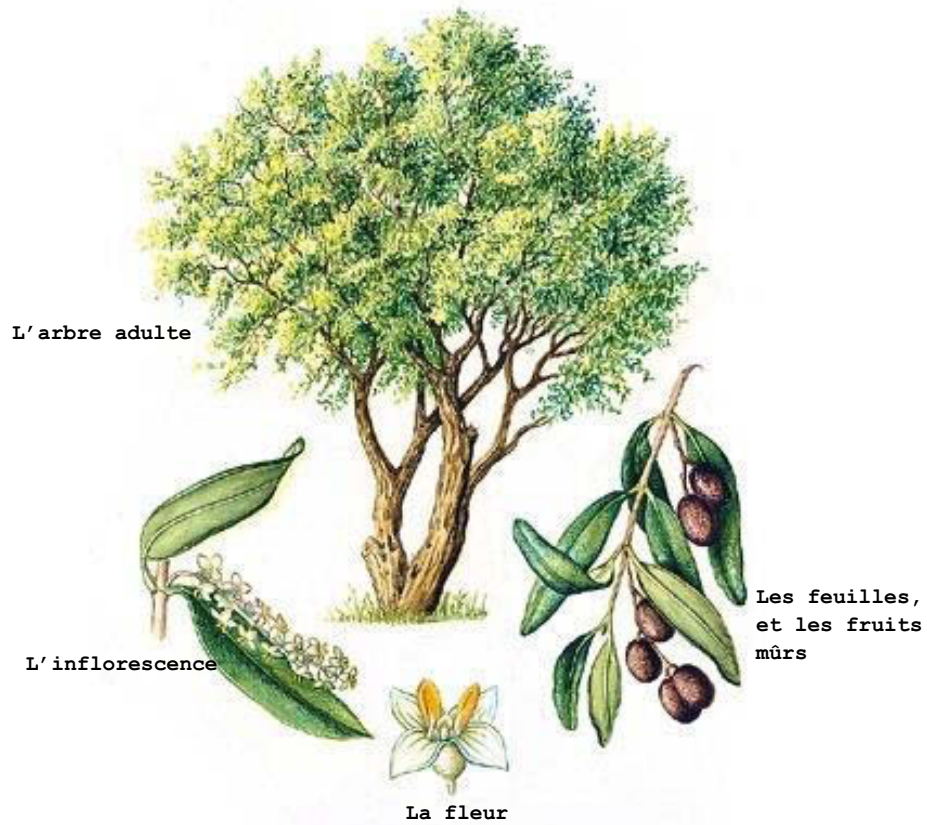
Chapitre



Introduction générale

Introduction générale

(A)



(B)

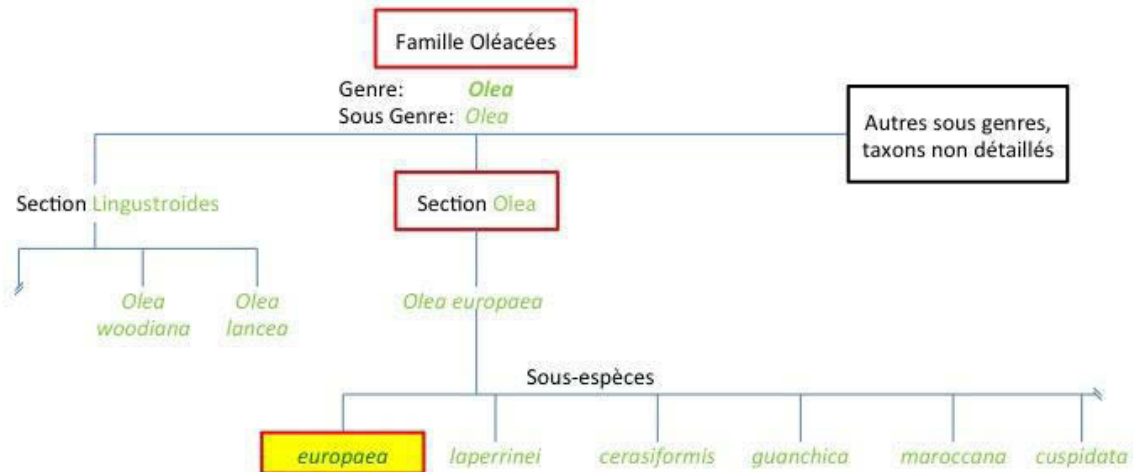


Figure 1. (A) Planche d'illustration d'*Olea europaea* (Dessin Chantal Beaumont - Archives Larousse). (B) Classification phylogénétique d'*Olea europaea*.

Introduction générale

1 -L'olivier

L'olivier est une espèce méditerranéenne domestiquée très ancienne. Il appartient à la famille des Oléacées, genre *Olea*, espèce *Olea europaea* (figure 1). Il se distingue par deux sous-espèces : *Olea europaea sylvestris* (l'olivier sauvage) et *Olea europaea sativa* (l'olivier cultivé) (Villa, 2003). Son fruit, l'olive, et dans une moindre mesure son bois, offrent de nombreuses possibilités économiques. Cette espèce vivace se caractérise par un potentiel de survie élevé en raison des caractéristiques d'adaptation de son système racinaire à des conditions environnementales très arides.

L'olivier tirerait ses origines de l'Asie, il y a plus de 9000 ans. L'olivier cultivé, *Olea europaea sativa*, proviendrait de la variété sylvestre *Olea chrysophylla laen*, par le biais de l'olivier sauvage (*Olea europaea sylvestris* ou l'olivier sauvage). Sa culture aurait débuté en Palestine, Syrie et Phénicie. Des fouilles archéologiques ont permis de mettre à jour sur un site en Basse Galilée (Israël) des traces d'huile d'olive datant d'au moins 8000 ans. Les premières mentions historiques de sa culture seraient apportées par les Sumériens et le Peuple d'Égypte dès la VII^{ème} dynastie (2400 environ avant J.-C.). Sa diffusion large dans les îles grecques puis dans tout le pourtour du bassin méditerranéen aurait débuté par les phéniciens à partir du 16^{ème} siècle avant J.-C. L'implantation de l'olivier dans toutes les provinces du pourtour de la Méditerranée fut généralisée sous l'Empire Romain.

Si le bassin méditerranéen est considéré comme le berceau de nombreuses civilisations disparues ou présentes, l'olivier fait intégralement partie de leur histoire respective. En effet, des croyances de l'Égypte Ancienne à celles d'aujourd'hui, l'olivier véhicule de nombreux symboles culturels qui rejoignent toutes les cultures ; il est un symbole de longévité, de fertilité et de maturité. Aujourd'hui, l'olivier a dépassé les frontières de son aire d'installation originelle, pour se retrouver planté dans des pays comme le Mexique, le Pérou, l'Argentine, les USA (en Californie tout particulièrement), le Pakistan, la Chine ou l'Australie. Sur les coteaux des pays méditerranéens, poussent des oliviers apparemment sauvages. Bon nombre d'entre eux seraient des oléastres. Longtemps regardés comme les ancêtres des oliviers cultivés, ils seraient issus d'arbres jadis exploités et qui auraient retrouvé leur l'état sauvage.

Quels que soient les faciès culturels et culturels qui ont enraciné l'olivier dans leur quotidien, les populations réparties sur l'ensemble des rives de la Méditerranée ont su profiter de sa culture et de ses bienfaits. Outre l'olive et son produit dérivé phare, l'huile, les populations ont utilisé également les troncs et branchages pour le travail du bois (coffres, vaisselles, bijoux etc), la valeur calorique des grignons d'olives* pour le bétail, et parfois certaines margines** comme engrais biologique sur sols sableux et relativement pauvres.

*Les **grignons d'olives** sont un sous-produit solide résultant du processus d'extraction de l'huile d'olive composé des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux.

Les **margines sont des effluents liquides générés par la fabrication de l'huile d'olive.

2 -L'oléiculture en Tunisie

Le secteur agricole en Tunisie constitue un moteur crucial dans le dynamisme de l'économie nationale. En effet, l'agriculture est une source importante de moyen de subsistance des populations rurales qui représentent encore près d'un quart de la population totale en Tunisie. Parmi les espèces végétales avec un fort intérêt agronomique pour la Tunisie, les oliviers occupent une place de choix.

Introduction générale

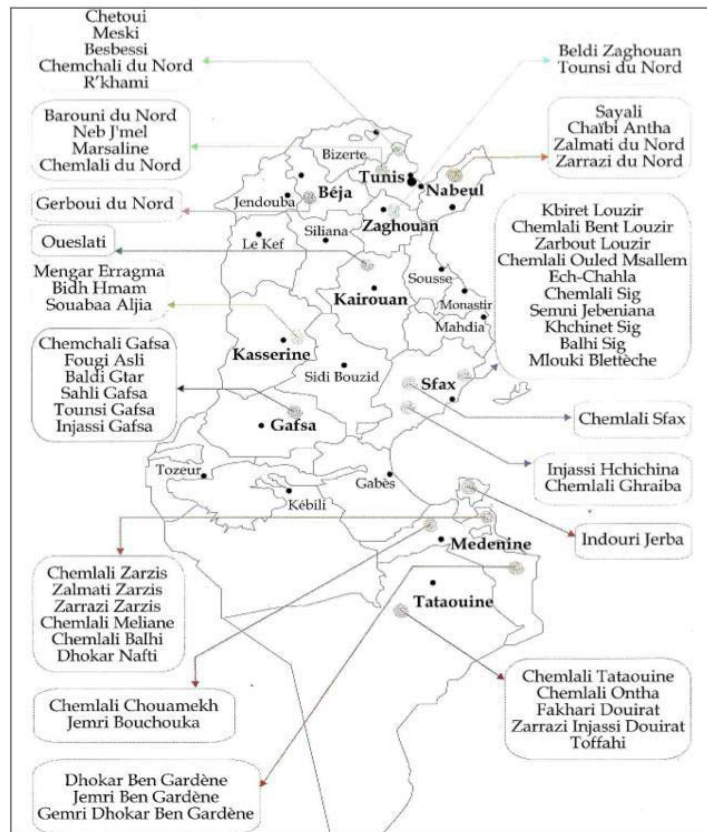


Figure 2. Sites et répartition géographique des variétés agronomiques autochtones et des types locaux d'olivier en Tunisie (Trigui *et al.*, 2002)

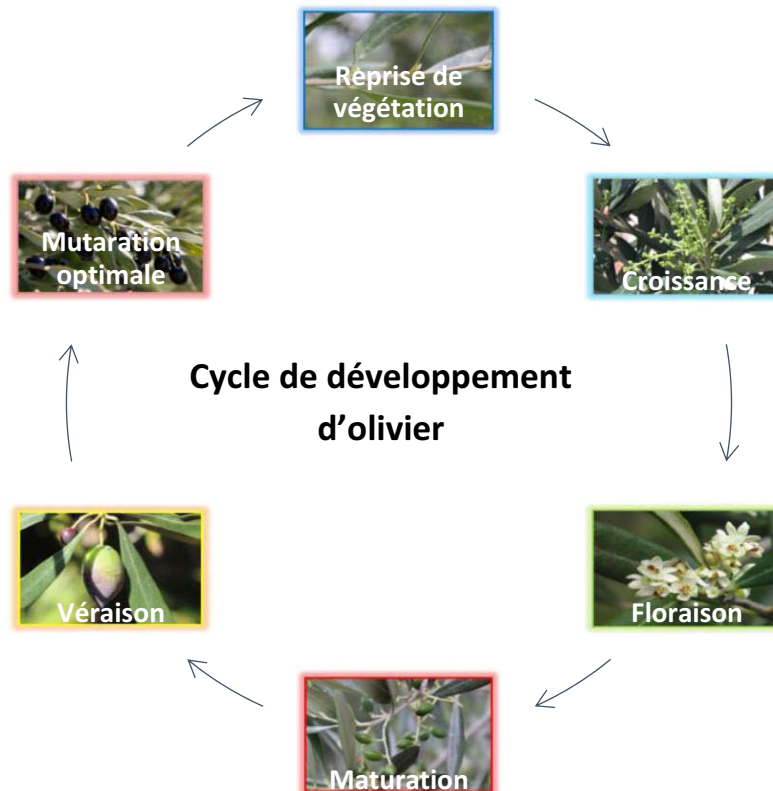


Figure 3. Les phases végétatives chez l'olivier au cours d'une année.

Introduction générale

A titre d'exemple, sa culture contribue à la création d'emplois avec une moyenne de 30 millions de journées de travail par an.

La Tunisie compte environ 83 millions d'oliviers (Office national de l'huile, 2015) qui couvrent plus du tiers des surfaces arables. Ainsi, elle correspond à presque 20% de la superficie mondiale oléicole, et elle occupe le quatrième rang mondial en production de fruits et d'huile de même nom.

La répartition géographique des plantations oléicoles est principalement concentrée dans les régions centrales (Sousse, Monastir, Mahdia, Sfax, Kairouan, Kasserine et Sidi Bouzid) avec 1,18 millions d'hectares et 40,6 millions d'oliviers. Quant au Nord (Tunis, Ariana, Ben Arous, Nabeul, Bizerte, Beja, Jendouba, Kef, Siliana et Zaghouan) et au sud (Gafsa, Gabès, Médenine, Tozeur, Tataouine et Kebelli), les plantations d'oliviers s'étalent respectivement sur 277000 hectares et 382000 hectares (30,2 et 13,5 millions d'arbres) (Office national de l'huile, 2015). Les régions de Sousse, Monastir, Mahdia, Sfax, Médenine, Kairouan, Sidi Bouzid, Nabeul, Siliana, Zaghouan, Kasserine, Kef et Gafsa sont les principales zones de production d'huile d'olive, et regroupent 87% de la plantation nationale (Gharbi et al., 2014). Actuellement en Tunisie, les oliveraies sont majoritairement constituées de plants en âge de pleine production (entre 5 et 50 ans). La pyramide des âges des oliveraies se structure ainsi:

- 31 % d'oliviers jeunes (1 à 5 ans),
- 54 % en production (20 à 70 ans),
- 15 % de vieux oliviers (plus de 70 ans).

Les plantations d'olivier renferment un assortiment de variétés relativement riche. Chacune requiert des conditions édaphiques et climatiques qui conditionnent sa zone d'implantation. Parmi ces variétés agronomiques, nous rencontrons principalement Barouni, Chemlali, Chemlali Gafsa, Chetoui, Jarboui, Oueslati, Zalmati et Zarrazi (Gharbi et al., 2014) (figure 2). De nombreuses variétés agronomiques qui sont implantées dans chaque zone de culture ont été initialement choisies parmi le matériel disponible dans l'environnement. Actuellement, avec les nouvelles exigences en matière de qualité des huiles et de résistance aux parasites, le choix de ces variétés est devenu un enjeu stratégique (Trigui et al., 2002). Mais aujourd'hui, deux variétés agronomiques sont majoritairement cultivées. La première variété agronomique est Chemlali (Chemlali Sfax, Chemlali Zarzis, Chemlali Djerba, Chemlali Tataouine...) qui occupe 85% de la surface oléicole tunisienne (Office national de l'huile, 2015). La seconde variété agronomique est Chétoui. Elle occupe 15% de la superficie oléicole et est plantée surtout dans la bande côtière du nord. Les variétés agronomiques destinées préférentiellement à la production d'huile sont Chemlali, Chétoui, Oueslati, Zalmati, Zarrazi, Barouni, Chemlali et Gafsa. Quant aux variétés dites à olives de table, elles comprennent Meski, Besbesi, Marsaline, Limli et Limouni. A côté de ces variétés agronomiques locales, quelques variétés étrangères sont également implantées avec par exemple les variétés Picholine, Manzanilla, Arbosana, Arbequina, Koroneiki et Coratina (Trigui et al., 2002).

Au cours du cycle annuel de développement, l'olivier passe par différentes phases végétatives (Walid et al., 2003) (figure 3), dont les plus importantes sont :

- l'induction, l'initiation et la différenciation florale en janvier et février,
- la croissance et le développement des inflorescences à l'aisselle des feuilles en mars,
- la floraison en avril,
- la Fécondation et la nouaison qui s'initient fin avril-début mai,
- la maturation des fruits de juin à août,
- la véraison en septembre,



Figure 4. Répartition du phénomène de dépérissement de l'olivier en Tunisie (Triki *et al.*, 2009).

Introduction générale

- la maturation optimale du fruit (son calibre final et son remplissage en huile) en octobre,
- la récolte qui s'étale de mi-novembre à janvier.

Physiologiquement, la période la plus intense pour les oliviers s'étale de mars à juin. Au cours de cette période, l'olivier a besoin d'une grande quantité d'eau et de nutriments. Cependant, l'éveil physiologique de la plante et les températures printanières généralement douces offrent malheureusement une période très favorable pour le développement et l'attaque d'agents phytopathogènes. Etant donné l'enjeu économique des produits découlant de l'exploitation de plants d'olivier, la lutte contre ces parasites reste donc stratégique et est réalisée majoritairement par l'emploi de fongicides de synthèse chimique. Et pourtant, des solutions alternatives plus respectueuses de l'environnement et des consommateurs existent, et elles méritent d'être plus abondamment utilisées. Elles seront exposées dans ce mémoire.

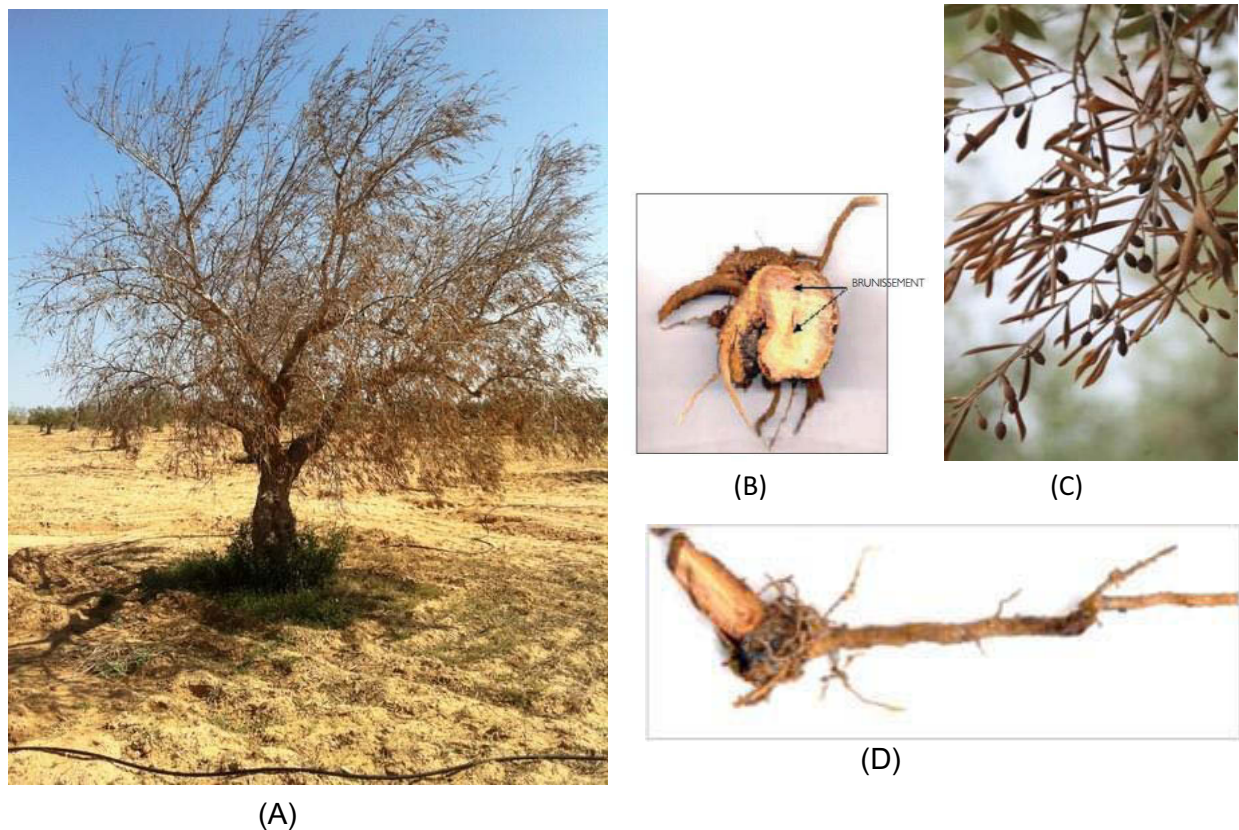
3 - Programmes génétiques chez l'olivier

La connaissance de la diversité génétique et des gènes d'intérêts chez l'olivier est indispensable pour organiser sa conservation et gérer son exploitation. Mais en dépit de l'importance économique, culturelle et écologique des oliveraies dans la région méditerranéenne, l'olivier reste relativement mal caractérisé sur les plans génétique et génomique. Par exemple, les gènes contrôlant la qualité agronomique restent encore méconnus même si dans les trente dernières années des études moléculaires approfondies ont été menées (Rugini et al., 2011). L'olivier une espèce diploïde ($2n = 46$) (Green et al., 1989), dont la taille du génome est estimée à 1,8Gpb (Loureiro et al., 2007). Les croisements avec d'autres sous-espèces sont possibles. Ils permettent la production de descendants fertiles, donnant accès à un grand bassin de variabilité génétique. Au cours des deux dernières décennies, de nouvelles connaissances sur la génétique de l'olivier ont été produites, avec le développement de marqueurs moléculaires nucléaires et plastidiaux et la création de cartes de liaisons génétiques. Ces recherches en génétique sur olivier sont indispensables car elles permettent d'une part de mieux caractériser les génotypes et écotypes présents sur le territoire, et d'autre part d'identifier des gènes d'intérêts agronomiques et des déterminants génétiques impliqués dans des caractères de résistance à différentes maladies, ou dans la production et la qualité de l'huile d'olive.

4 - Le phénomène de dépérissement chez l'olivier

Comme toutes les espèces végétales, et en particulier celles dites agronomiques dont la plupart sont issues d'actes successifs de domestication (paradoxalement synonymes d'érosion génétique), l'olivier est victime de contraintes abiotiques (ou maladies physiologiques) causées par des inadéquations environnementales telles la sécheresse, la carence minérale ou l'utilisation inappropriée de produits chimiques, et de contraintes biotiques qui sont la résultante d'activité de virulence d'agents nuisibles comme les phytopathogènes (ou parasites) et les ravageurs (Boulila, 2011). Parmi les parasites, les cryptogames (champignons parasites) occupent une place prépondérante. Quelles que soient les espèces fongiques parasitaires, les maladies cryptogamiques chez l'olivier se manifestent par des symptômes classiques de flétrissement de tout ou partie de la plante, provoquant son déclin et ultimement sa mort (Boulila, 2011).

Introduction générale



(A): Flétrissement d'olivier

(C): Jaunissement des feuilles

(B): Brunissement du bois de collet

(D): Dépérissement racinaire

Figure 5. Symptômes de dépérissement (fusariose) sur oliviers et différents organes (Collections des photos de Triki).

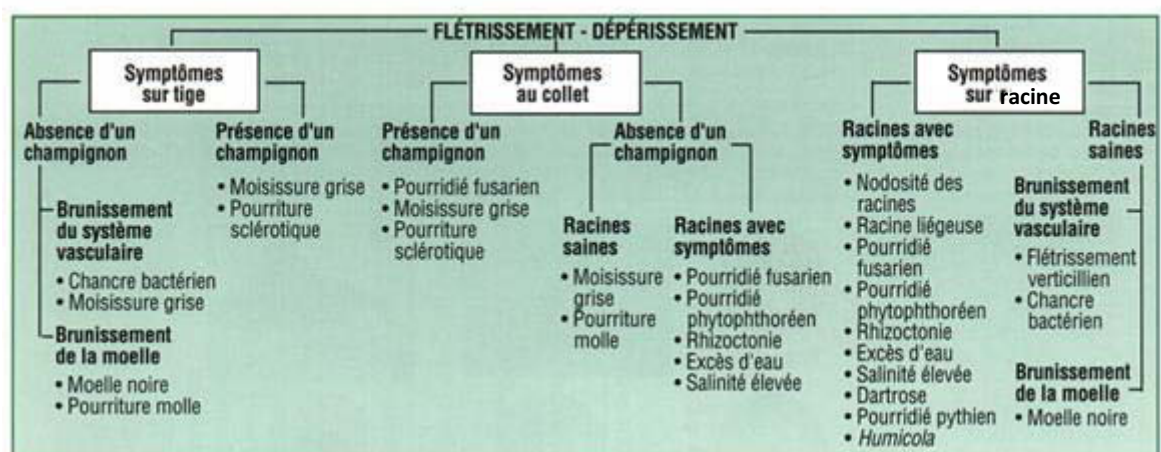


Figure 6. Approche systématique pour des origines de dépérissement (Laverdière et Lacroix, 2008).

Introduction générale

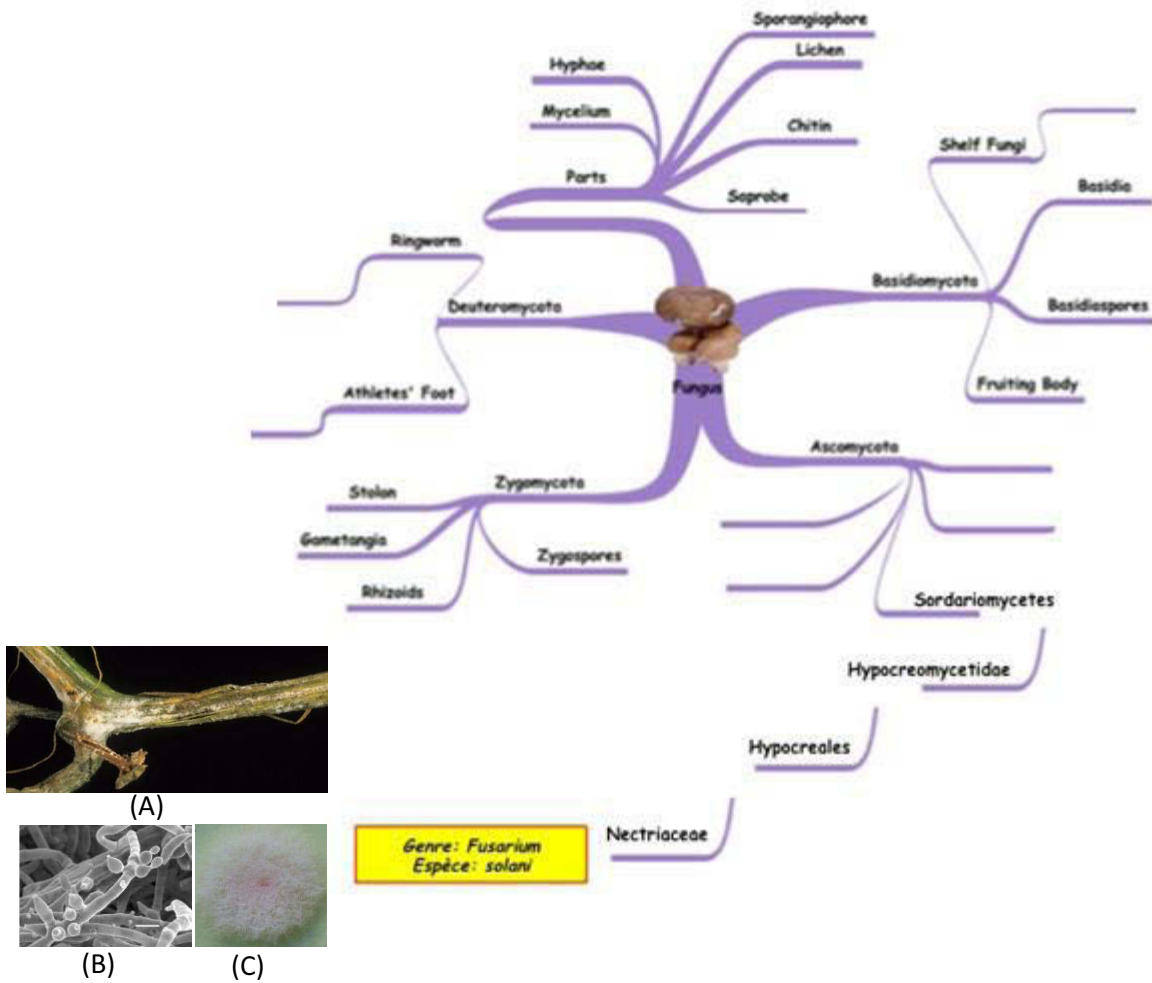
Ces flétrissements résultent inévitablement d'un ensemble de dérèglements physiologiques qui *in fine*, bénéficient à l'installation infectieuse de l'agent envahisseur (relation trophique unilatérale qui définit *stricto sensu* la relation parasitaire). Si ces flétrissements surviennent brutalement et frappent tout l'arbre, ce phénomène se nomme une apoplexie. Dans le cas d'un dépérissement progressif et continu, l'arbre perd en premier lieu ses feuilles puis ses branches ; cela correspond à la configuration la plus fréquente.

En Tunisie, et plus précisément dans les différentes régions du sud ouest (Gafsa, Chebika, Ben Aoun), centrales (Ennadhour, Kairouan, Sbikha) ou du nord (Bousalem), les problèmes de dépérissement sont généralement dus à la présence de nombreux cryptogames (figure 4). Des attaques sont observées sur des jeunes plants issus de petites boutures, ou sur des oliviers adultes (voire âgés) en pleine potentialité de production avec des niveaux de développement des symptômes variables (Boulila, 1994, 2011 ; Triki et al., 2010).

Dans le détail, les symptômes de dépérissement chez l'olivier apparaissent par un dessèchement partiel ou complet du plant (figure 5) (Boulila et al., 2011 ; Triki et al., 2006 ; Jardak et al., 2007 ; Bouzoumita et al., 2016). Les oliviers malades présentent un aspect "grêlé", avec des branches portant des brindilles mortes, et/ou des feuilles en taille et en nombre réduits. Les feuilles présentent un aspect jaunâtre au printemps qui s'accroît vers un jaune doré plus tard en saison. Cette couleur persiste durant toute la saison estivale mais avec l'arrivée de l'automne, curieusement le végétal commence à retrouver un feuillage de couleur vert-pale. Et pourtant, la plante garde un aspect faible et dégarni. Lors d'une attaque forte, les feuilles commencent à se nécroser par leur extrémité et finissent par se dessécher. Il s'ensuit une chute des feuilles très importante qui se répercute sur les inflorescences. Celles-ci se déshydratent, brunissent et meurent. Si la nouaison a eu le temps de s'établir, les fruits restent limités en nombre, perdent du volume, se rident et tombent prématurément (Boulila, 1994).

L'origine biotique d'un état de dépérissement chez l'olivier est multiple (Laverdière et al., 2008) (figure 6). Plusieurs espèces de champignons telluriques mais pathogènes sont capables d'infecter les racines des plantes sauvages et cultivées. Parmi ces champignons, sont souvent incriminés des ascomycètes avec des espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Verticillium*, des basidiomycètes avec des espèces telles *Rhizoctonia solani*, *Armillaria mellea* et *Corticium rolfsii*. D'autres encore sont classifiés en tant qu'oomycètes avec par exemple *Aphanomyces*, *Phytophthora* et *Pythium*. Ces cryptogames causent des maladies avec des symptômes de flétrissement communs qui sont consécutifs à des pourritures racinaires et/ou à l'obstruction des vaisseaux conducteurs de la plante infectée (Agrios, 2005). Leur présence engendre un risque élevé pour la santé et la pérennité des cultures, auquel cas, ces agents phytopathogènes engendrent des pertes qui peuvent s'avérer être très élevées pour les oléiculteurs (Boulila, 2011). Dans ce chapitre, nous mettons l'accent sur les dépérissements d'origine fongique, en l'occurrence ceux causés par *Fusarium solani*.

Introduction générale



(A) Symptomes de la Fusariose sur le collet (B) Aspect microscopique du *Fusarium*
(C) Aspect macroscopique du *Fusarium*

Figure 7. Classification taxonomique de *Fusarium solani*.

Introduction générale

5 - Le genre *Fusarium*

5.1 - Concepts généraux

Les *Fusarium* sont des champignons cosmopolites, généralement présentés en tant qu'organismes telluriques capables de survivre longtemps sous forme de chlamydospores (des spores à paroi épaisse et issues de multiplication végétative). Cependant, ils sont également retrouvés dans l'eau ou adsorbés sur des particules en suspension dans l'air ou sur des organismes eucaryotes pluricellulaires (débris morts comme vivants). Certaines espèces sont parasites et souvent présentées comme faisant parties des cryptogames telluriques les plus agressifs. Ainsi, toutes les lésions occasionnées par l'activité pathogénique d'un *Fusarium* sont qualifiées de manière non spécifique de fusariose. Dans le cas où ils ciblent comme organisme hôte des espèces végétales, certains *Fusarium* causent des flétrissements (fusariose vasculaire ou *fusarium vascular wilt*) et des pourritures (pourriture fusarienne ou selon *fusarium root rot* / *fusarium crown rot*), ce qui engendre d'importants dégâts sur des plantes sauvages ou cultivées en champ, ainsi qu'en serre (Benhamou et Chet, 1997 ; Boulila, 2011 ; Ma et al., 2013).

La répartition géo-climatique des *Fusarium* est très étendue et diversifiée. Ces champignons filamenteux évoluent dans les régions tempérées comme tropicales. Mais ils sont rencontrés également dans des environnements climatiques extrêmes tels les déserts, en très hautes altitudes et les régions polaires (Dignani et Anaissie, 2004). De même, plusieurs espèces de *Fusarium* (dont *F. solani*) ont été isolées dans de la poussière atmosphérique et de l'eau de pluie. Ces dernières données sont très précieuses car elles éclairent sur les modes et pouvoirs de dispersion, parfois sur de très longues distances, de ce pathogène par la pluie et le vent (Ruiz-Palmero et al., 2011).

Enfin, d'un point de vue taxonomique, le genre *Fusarium* appartient à la classe des Ascomycètes. Ce groupe frère des Basidiomycètes regroupe l'ensemble des organismes dont les spores sont formées, au cours du cycle cellulaire, à l'intérieur d'asques. Puis, le genre *Fusarium* appartient à l'ordre des *Hypocreales*, et à la famille des *Nectriaceae*. Il s'agit d'un genre polyphylétique à la taxonomie très complexe. Ainsi, certaines espèces possèdent des formes sexuées (ou téléomorphes) tandis que d'autres ne sont connues que sous une forme asexuée (ou anamorphe). Actuellement, le genre *Fusarium* comprend plus de 300 espèces phylogénétiquement distinctes, avec 20 espèces complexes et neuf lignées monotypiques. La plupart des espèces pathogènes de *Fusarium* appartiendrait aux complexes *F. oxysporum* et *F. solani* (Balajee et al., 2009 ; O'Donnell et al., 2015). C'est sur ce dernier complexe d'espèces, *F. solani*, que notre intérêt se porte. La classification taxonomique complète et en vigueur pour cette espèce (ou complexe d'espèces) est donnée figure 7.

5.2 - *Fusarium solani*

Fusarium solani est membre d'un clade monophylétique qui comprend environ 60 espèces phylogénétiques connues sous le nom de "complexe d'espèces *Fusarium solani*" (ou *Fusarium solani* Species Complex, FSSC) (O'Donnell, 2015 ; Geiser et al., 2013). Plusieurs espèces sont douées de virulence et sont alors responsables de maladies souvent associées à des pourritures racinaires sur une gamme vaste et diversifiée d'une centaine de plantes hôtes. Les espèces hôtes prédominantes sont les cultures maraichères, les



Figure 8. Aspect macroscopique de *Fusarium solani* (souche *Fso14*, utilisée dans ces travaux de thèse) après 8 jours de culture sur milieu PDA.

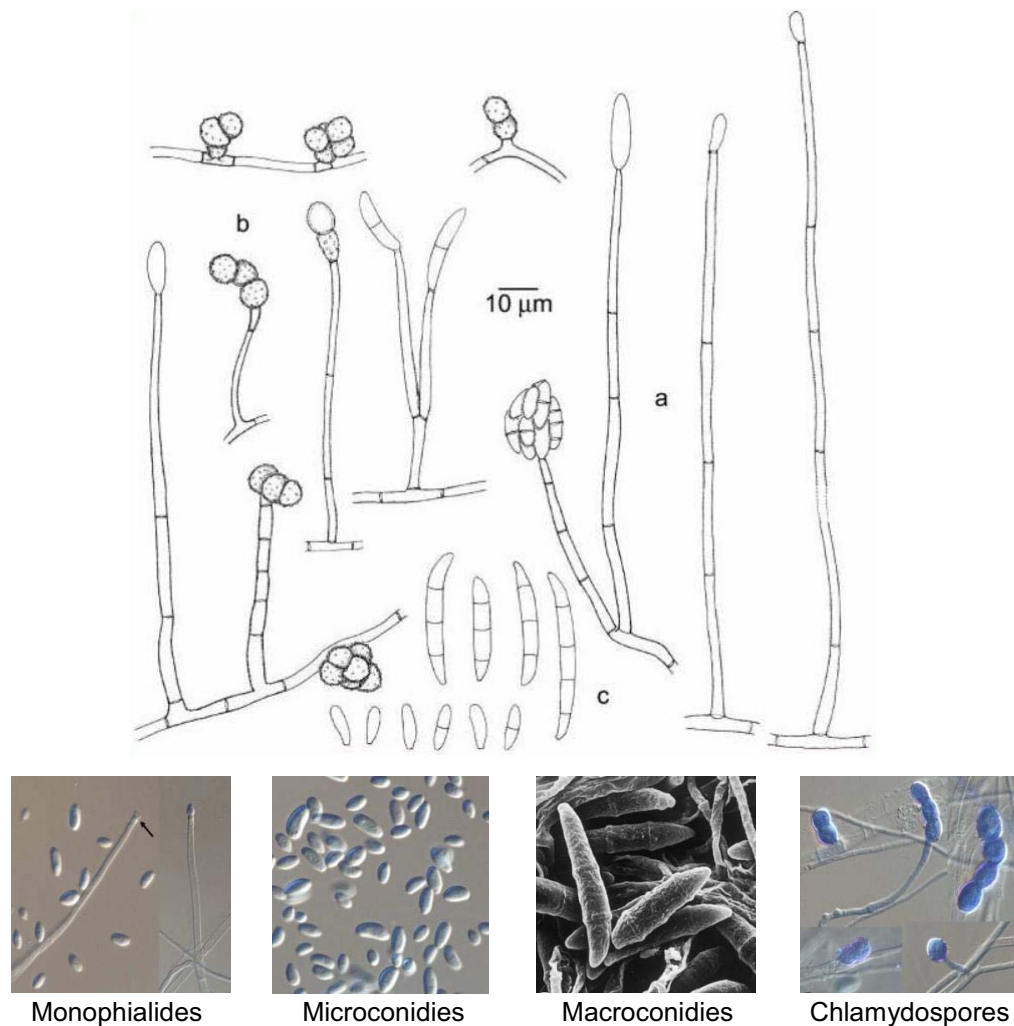


Figure 9 Structure microscopique de *Fusarium solani* (exemple de la souche CBS 490.63) (a, conidiophores avec monophialides ; b, chlamydospores ; c, micro et macroconidies).

Introduction générale

légumineuses et les cucurbitacées. Mais certaines espèces pérennes font parties de leur hôte cible. Par conséquent, la nomenclature des espèces biologiques individuelles (*formae speciales*, f. sp.) du FSSC est principalement liée à celle de la plante hôte colonisée : par exemple *F. solani* f. sp. *pisi* sur le pois ou *F. solani* f. sp. *lentis* sur la lentille. Enfin, le complexe d'espèces *F. solani* serait la forme anamorphe de *Nectria haematococca* (de Hoog et al., 2011).

5.3 - Morphologie des *Fusarium*

Sur milieu de culture classique de type PDA, les *Fusarium* poussent assez rapidement et présentent habituellement des mycéliums aériens de couleur blanchâtre à crème (figure 8). Les formes imparfaites (anamorphiques) sont caractérisées par des filaments aériens ou mycélium, systématiquement septés (ou cloisonnés), sur lequel émergent perpendiculairement des conidiophores (de type monophialides avec une collerette distincte). Ces conidiophores peuvent générer des conidies hyalines généralement unicellulaires (figure 9). *Fusarium* produit trois types de spores asexuées, le plus souvent sous forme de fuseau (d'où le genre *Fusarium* tire son nom latin, *fuscus*) : les microconidies, les macroconidies et les chlamydo-spores (Nelson et al., 1983 ; Agrios, 2005).

- Les microconidies, unies ou bicellulaires, mesurent environ 2,0-4,5 à 8-16 μm . Elles sont parfois disposées en chaînettes ou agglutinées en fausses têtes, et se présentent souvent sous la forme de virgules ou ellipsoïdales. Elles sont produites abondamment par des conidiophores allongés et verticillés quelles que soient les conditions environnementales. Ces microconidies sont le type de spores le plus fréquemment observé à l'intérieur des vaisseaux de plantes infectées.
- Les macroconidies, d'aspect fusiforme et/ou de croissant (faucille) confèrent l'un des principaux critères morphologiques d'identification des *Fusarium*. Deux fois plus volumineuses que les microconidies avec des tailles d'environ 4-6 à 28-42 μm , elles sont cloisonnées et se composent de trois à cinq cellules ou septa (Larone, 1995). Elles sont produites par des conidiophores courts et branchés, et sont généralement observées côte-à-côte sur un stroma mycélien saillant en forme de coussin. Cet ensemble appelé sporodochium est observé à la surface des organes végétaux qui ont été tués par l'agent pathogène.
- les chlamydo-spores sont des spores rondes généralement observées au milieu des hyphes ou en position terminale, souvent par paires, parfois en triplets mais rarement agglomérées entre elles. Elles mesurent de 6 à 10 μm de diamètre. Elles sont entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée. Cette paroi épaisse leur permet de subsister d'une année sur l'autre dans un sol ou sur des débris végétaux en cours de décomposition ou déjà décomposés. Elles sont comparées à des structures de dormance. Elles resteraient donc dormantes jusqu'à la stimulation de leur germination par des substrats organiques ou des exsudats racinaires. Leur germination engendre la formation d'un nouveau mycélium, produisant à son tour des conidies (Beckman et Roberts, 1995 ; Agrios, 2005).

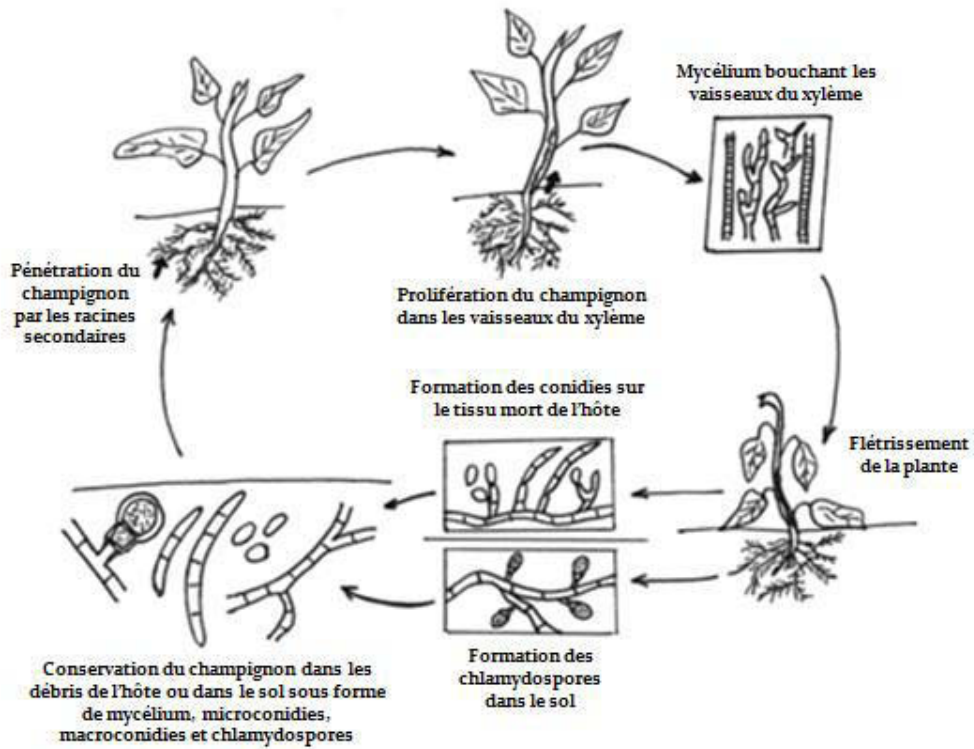


Figure 10. Cycle de la maladie du flétrissement causé par *Fusarium solani* (d'après Nasraoui, 2006).

Introduction générale

5.4 - Les symptômes de *Fusarium*

Les *Fusarium* sont responsables d'importants dégâts qui peuvent survenir à tout moment dans le cycle de développement de la plante hôte. Son mode d'inoculation serait essentiellement assuré par les semences récoltées de plantes infectées, mais survient également à partir de sols contaminés. Dans ce dernier cas, *Fusarium* infecte les plantes par un développement mycélien déjà actif dans le sol, ou consécutif à la germination de conidies et de chlamydospores en dormance (figure 10). En contact avec une plante hôte, le mycélium envahit les racines en pénétrant par des blessures ou des sites qui sont différents selon les espèces de *Fusarium*. Par exemple, *F. oxysporum* sp. *conglutinans* pénètre au niveau des apex ou des zones en différenciation et d'élongation, alors que *F. oxysporum* sp. *lini* pénètre essentiellement au niveau des poils absorbants. Selon les sites de pénétration, l'infection débute par la perforation de l'assise épidermique. Pour certains pathosystèmes comme *F. oxysporum* sp. *Cubense* sur bananier ou *F. oxysporum* sp. *Batatas* sur pomme de terre, l'infection s'opère via des blessures (Beckman et Roberts, 1995, Li et al., 2013a). Après pénétration dans la racine, les hyphes croissent en direction du cylindre central pour atteindre les vaisseaux du xylème à l'intérieur desquels le mycélium prolifère abondamment, se ramifie puis débute la production massive de microconidies. Ces dernières se détachent des hyphes, et profitent du flux de la sève pour être véhiculées vers les parties aériennes de la plante hôte. Il s'ensuivra rapidement la destruction des vaisseaux infectés et leur obstruction en de nombreux points, responsable du flétrissement des parties situées plus en aval.

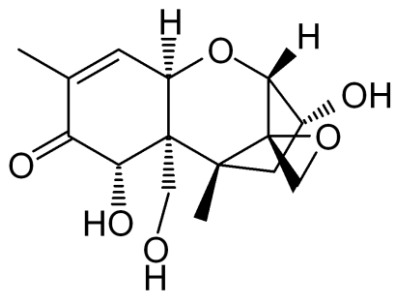
Ces événements structuraux chez la plante infectée -dits déviants- correspondent aux symptômes primaires (pourriture des racines et du collet), et seront responsables des symptômes secondaires de flétrissements de la partie aérienne de la plante (Boulila et al., 1994 ; Agrios, 2005 ; Triki et al., 2006 ; Jardak et al., 2007). Le flétrissement de la plante, aussi décrit à travers le flétrissement vasculaire, est la "maladie" qui provoque le plus grand nombre de dégâts dans les cultures. Elle est le plus souvent diagnostiquée dans des conditions édaphiques relativement chaudes et dans les serres. Il est généralement mis en cause la sporulation du champignon. En effet, les présences de mycélium et des microconidies, éventuellement aggravées par les réponses locales de défenses de la plante (notamment avec la formation de thyloses, et la sécrétion de gommes), vont occasionner un blocage du transport d'eau dans les vaisseaux infectés (Klein et Correll, 2001).

Les symptômes engendrés correspondent donc à une situation de privation d'eau extrême liée à un envahissement massif des vaisseaux conducteurs dans lesquels *Fusarium* sporule abondamment. Selon la plante considérée, les symptômes sont très variables. Ils se manifestent par un éclaircissement de la nervure, la chlorose des feuilles suivie de leur dessèchement. En cas d'attaque sévère, la plupart des plantes flétrissent et meurent rapidement, tandis que les plantes les moins affectées deviennent chétives et non productives (Agrios, 2005) ; quoi qu'il en soit, les plants les moins sensibles mais atteints par la maladie n'en restent pas moins des foyers contagieux.

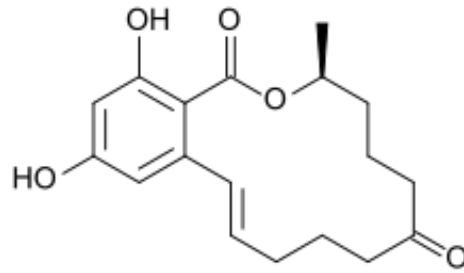
5.5 - Impacts agro-économiques et sociétaux

Ce champignon tellurique sévit partout dans le monde, y compris dans plusieurs pays du bassin méditerranéen (Al Ahmed et Hamidi, 1984 ; Sanchez Hernandez et al., 1998 ; Porras et al., 2003). Sa dissémination se réalise majoritairement au niveau du sol via les eaux de

Introduction générale



Déoxynivalénol



Zéaralénone

Figure 11. Structure moléculaire du Déoxynivalénol (DON) et du Zéaralénone (ZON).

Introduction générale

ruissellement, et le vent ou les éclaboussures. De même, plusieurs activités humaines sont incriminées, comme par exemple certaines pratiques culturelles qui impliquent l'utilisation d'équipements contaminés ou l'importation dans les exploitations agricoles de terreaux ou de plants et semences contaminés (Nasraoui, 2006).

Depuis quelques années, une recrudescence de la fusariose est enregistrée. Curieusement, beaucoup d'agriculteurs ignorent l'origine de cette maladie et les moyens de lutte à adopter pour limiter son inexorable et rapide expansion. De nombreux fongicides de synthèse chimique sont proposés. Cependant leur formulation s'avère souvent quasi -voire totalement- inefficace contre les maladies vasculaires fusariennes. Enfin, dès lors où *Fusarium* est introduit dans un sol, il est impossible de l'éliminer d'autant qu'il présente une forte capacité à y persister plusieurs années. Ceci est notamment associé à la présence de chlamydospores et de mycélium capable de survivre sur des débris, voire de coloniser certaines espèces végétales environnantes (dont certaines cultivées) et qui sont considérées porteuses saines sur lesquelles il n'induit pas de maladie (par exemple : *F. oxysporum* f.sp. *nicotianae*, l'agent responsable de la fusariose du tabac qui est hébergé chez le coton, l'okra ou le soja) (Nelson et al., 1981).

Outre le fait que *Fusarium* impacte significativement la pérennité sanitaire de grandes cultures annuelles (*i.e.* céréalières) ou pérennes (*i.e.* vergers), et donc le revenu des cultivateurs et des secteurs économiques apparentés (*i.e.* stockeurs, transformateurs etc), sa présence est également source d'inquiétude pour les consommateurs. En effet, le genre *Fusarium* est connu pour sécréter une large gamme de toxines (phytotoxines et mycotoxines). Ces toxines confèrent un pouvoir pathogène important vis-à-vis des organismes hôtes (et donc dans l'induction de la maladie), bien que leur sécrétion ne semblent pas être corrélée systématiquement avec les niveaux de pathogénicité du champignon. Sauf que nombre d'entre elles peuvent contaminer la production alimentaire courante à base de plants infectés, d'autant que leur structure chimique particulière leur confère une grande stabilité responsable de leur large transfert dans la chaîne alimentaire. Ces toxines impactent sérieusement la santé des animaux et des humains dès lors où elles sont ingérées. En effet, elles n'induisent pas de réponse du système immunitaire et peuvent présenter quatre types de toxicité: aiguë, chronique, mutagène et tératogène. A maintes reprises, ces toxines ont façonné l'histoire de l'Humanité soit en tant que fléau (ergotisme...) soit positivement (antibiotiques, anticancéreux...), et aujourd'hui, elles font l'objet d'une surveillance aigüe. Ces toxines sont traitées dans le chapitre suivant.

5.6 - Les toxines de *Fusarium*

Les toxines fongiques sont des métabolites secondaires et ne joueraient aucun rôle dans la croissance du champignon si ce n'est indirectement en façonnant son environnement biotique proche (compétition avec d'autres organismes etc). Parmi les cinq familles de mycotoxines les plus importantes, *Fusarium* aurait le pouvoir de sécréter des fumonisines, des trichothécènes et de la zéaralénone, avec des quantités variables en fonction des espèces (Pitt, 2000). Mais les toxines produites par *Fusarium* les plus connues sont le déoxynivalénol (DON) et le zéaralénone (ZON) (figure 11). La présence de ces toxines est très surveillée dans l'alimentation humaine et animale en raison de leur fréquence d'apparition récurrente dans divers produits agricoles telles les céréales. Dans l'immense majorité des cas, leurs quantités sont infimes, mais des pics de contamination sont parfois observés, dépassant les seuils de concentration toxique sanitaire acceptable (Placinta et al., 1999).

Introduction générale

Le DON est chimiquement décrit comme 12,13- époxy-3, 4, 15-trihydroxytrichothèque-9-en-8-un ($C_{15}H_{20}O_6$, MW: 296,32, CAS: 51481-10-8). Il cristallise sous forme d'aiguilles incolores et est stable à des températures élevées (stable à 120 °C, modérément stables à 180 °C). Il est soluble dans l'eau et dans des solvants polaires (AESA, 2004a). Le nom trivial "vomitoxine" a également été attribué à cette toxine en raison de sa capacité aiguë à provoquer des vomissements (Vesonder et al., 1973).

Le ZON est une lactone d'acide résorcyclique et est chimiquement décrit comme 6- (10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undécène) lactone d'acide résorcyclique ($C_{18}H_{22}O_5$, MW: 318,36, CAS: 17924-92-4) (EFSA, 2004b). Cette toxine présente une structure cristalline de couleur blanche. Elle est insoluble dans l'eau, mais soluble dans une solution alcaline aqueuse et divers solvants organiques. Le ZON est stable au cours du stockage des denrées et de leur traitement dont la cuisson (toxine thermostable) (EFSA, 2004b).

Une attention particulière est constamment accordée à la co-occurrence de ces toxines. En effet, leurs modes d'action sont différents. DON est connu pour inhiber la synthèse des protéines (EFSA, 2004a ; Feinberg et McLaughlin, 1989 ; Rotter et al., 1996), tandis que ZON possède des propriétés oestrogéniques. A ce titre, cette molécule est classée dans le groupe des perturbateurs endocriniens (EFSA, 2004b ; Kuiper - Goodman et al., 1987).

6 - Les moyens de lutte requis dans le contrôle des agents du dépérissement

La nature des *Fusarium* pathogènes (surtout sous leur forme de chlamydospores) les rend capable de survivre au sein d'une rhizosphère pendant plusieurs années, dans des conditions les plus défavorables, et qu'ils soient en présence ou non de leurs plantes hôtes (Frederix et Den Brader, 1989). Comme pour la plupart des maladies causées par des cryptogames telluriques, les fusarioses ne peuvent donc pas être éradiquées en champs par l'emploi de fongicides de synthèse. De même, les pratiques culturales répondant par la destruction des débris de récolte des plantes atteintes de fusarioses, les jachères sur de très longues durées, la rotation culturale ciblant des cultures d'espèces cultivées non hôtes peuvent agir sur la densité de l'inoculum présent dans un sol (Edel et al., 1995 ; Scott et al., 2012). Néanmoins, là où l'agriculture intensive est hautement spécialisée et concerne tout particulièrement des essences pérennes, ces pratiques montrent très vite des limites. En effet, la rotation des cultures est impraticable sur le plan économique (Miguel et al., 2004). De plus, la pratique des cultures en rotation peut s'avérer totalement inefficace car certaines formes spéciales de *F. solani* (*F. sp. ciceris*, *melonis* et *lentis*) colonisent des espèces végétales voisines sans provoquer de symptômes apparents, se comportant tels des porteurs sains (Belabid, 2003). Enfin, de nombreux fongicides systémiques sont proposés pour lutter contre les maladies associées à des *Fusarium*. Cependant, leur emploi n'offrirait qu'une protection partielle (Song et al., 2004 ; Amini et Sidovich, 2010).

Le seul levier efficace limitant la propagation des maladies en champs est l'utilisation de variétés de plantes résistantes si elles sont disponibles. Cependant, les programmes d'amélioration variétale de la plupart des espèces agronomiques restent très longs et excessivement coûteux.

L'incidence de la fusariose dépend étroitement des caractéristiques pédologiques des sols, mais surtout de la population microbienne qu'il héberge (*i.e.* la pédofaune). Ce phénomène encore nommé "sols suppressifs" a permis la caractérisation de nombreuses espèces de bactéries et champignons dites antagonistes ou protectrices. Ces organismes participent

Introduction générale

dorénavant à la consolidation d'un concept de lutte dite biologique, utilisée aujourd'hui comme une des stratégies du contrôle des fusarioses. A ce titre, ces microorganismes sont qualifiés de BCAs (Biological Control Agents) et ont acquis un statut très particulier car ils présentent un fort intérêt agronomique.

Ce chapitre expose quelques moyens de lutte des phytopathogènes. De part leur multiplicité, ne sont traitées ici que les approches phytosanitaires qui sont majoritairement employées dans la protection des oliveraies contre des cryptogames, à savoir la lutte culturale, la solarisation, la lutte chimique et la lutte biologique. Un regard sera porté à la lutte biologique, et tout particulièrement à l'emploi des agents fongiques *Trichoderma* comme BCA.

6.1 - La lutte culturale

Ces dernières années, la multiplication de plants d'olivier est principalement assurée par la technique de bouturage. Pour aboutir à des plants sains et vigoureux, il est fortement recommandé d'utiliser des substrats indemnes d'organismes pathogènes, de s'assurer que le sol n'ait pas été préalablement infesté par les agents pathogènes, et que les terres des oliveraies n'aient pas supporté précédemment des cultures sensibles aux *Fusarium*. De même, il est fortement recommandé de respecter les densités de bouturage, d'enlever et d'incinérer les boutures pourries ainsi que les branches infectées ou mortes taillées, ou encore de désinfecter les outils de taille, et d'installer des systèmes de drainage efficaces (Vossen et al., 2008).

6.2 - La lutte génétique et greffage

Des variétés d'olivier résistantes sont créées et leur utilisation reste des plus efficaces économiquement et écologiquement. De toute évidence, les nouveaux génotypes résistants proposés doivent afficher également des caractères agronomiques intéressants. Ces génotypes d'intérêt agronomique majeur sont utilisés soit pour remplacer les arbres morts dans les oliveraies infestées par *Fusarium*, soit comme porte-greffes de greffons issus de cultivars déjà existants mais sensibles aux *Fusarium*, soit encore pour être incorporés comme géniteurs des programmes de sélection (Angiolillo et al., 1999).

Cette lutte génétique est souvent couplée à l'utilisation ciblée de porte-greffes résistants aux phytopathogènes. Par exemple, différentes études ont démontré que l'expression des symptômes au niveau des parties aériennes chez les cultivars sensibles est liée à l'effet population des pathogènes telluriques, et que les racines sont avant tout des réservoirs naturels de ces pathogènes. Par conséquent, l'utilisation de porte-greffes d'olivier résistants aux *Fusarium* est une approche complémentaire du contrôle génétique couramment employée. Ces porte-greffes sont sélectionnés pour résister à la pénétration de *Fusarium*, et empêcher toute tentative de colonisation du champignon dans les tissus des variétés greffées.

6.3 - La solarisation

La solarisation du sol est l'une des méthodes physiques de contrôle les plus efficaces pour réduire à moyen et long termes la densité populationnelle de différents pathogènes comme *Fusarium*, mais également *Verticillium* et *Rhizoctonia*. Cette méthode consiste en une "pasteurisation" du sol. Elle consiste en une élévation de la température des couches superficielles (jusqu'à 30-40 cm). Cette élévation thermique est assurée par l'énergie irradiante du soleil. Le résultat sera d'autant plus probant que la durée du traitement est

Introduction générale

suffisamment longue, environ 45 jours. Cette élévation thermique est obtenue en recouvrant le sol avec des films transparents de polyéthylène après un arrosage abondant. L'humidité assure une meilleure conduction de la chaleur en profondeur. Ainsi, les températures du sol peuvent atteindre des valeurs comprises entre 35 et 60°C (selon le type de sol et la profondeur). De plus, il est avancé que la solarisation présente l'atout majeur de détruire des champignons phytopathogènes (ainsi que des adventices), tout en préservant des champignons utiles (Vincent et al., 2000). Par exemple, cet effet sélectif permettrait de préserver les champignons antagonistes comme les *Trichoderma harzianum*, diminuant la nocivité de *Fusarium* ou *Verticillium* (Foury, 1994 ; Otero et al., 2014).

6.4 - La lutte chimique

Les champignons présentent un pic de développement durant les périodes chaudes et humides, entre mars et juin. Afin de limiter leur propagation, des traitements préventifs sont fortement conseillés, et ce à des périodes précises dans l'année, si possible avant l'apparition des symptômes de maladies. La bouillie bordelaise reste encore un traitement couramment appliqué. Cependant, des produits chimiques de synthèse dont la dangerosité pour l'environnement, les oléiculteurs et les consommateurs est démontrée, sont abondamment appliqués.

Par exemple, le Tachigaren est un fongicide doté de propriétés systémiques ascendantes. Il est actif sur différents champignons telluriques parasites responsables de la fonte des semis ou du dépérissement des plantes (*Pythium*, *Fusarium*...). La substance active est l'hymexazol. Son mode d'action est complexe et n'est pas complètement élucidé. Il interférerait avec la synthèse des acides nucléiques. Ainsi, il "empêcherait" la croissance du champignon, mais son action inhibitrice touche aussi la germination des spores. Par contre, il présenterait un effet stimulant sur les défenses naturelles de la plante et la croissance des racines par la formation de racines latérales. L'hymexazol doit être appliqué par trempage des racines et/ou par pulvérisation sur le sol. Il est ensuite rapidement absorbé par les racines et distribué dans toute la plante.

Autre fongicide, le carbendazime. Sa pulvérisation sur les troncs et branches arrête significativement les attaques de *Verticillium dahliae* pendant plusieurs mois (Tombesi et al., 2007 ; Triki et al., 2006). De même, il a été montré que le carbendazime exerçait une forte activité inhibitrice sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum*. Par contre il agirait modérément sur la germination des spores de ce même champignon.

De part leurs actions inhibitrices complémentaires, l'hymexazol et le carbendazime peuvent être utilisés en mélange, offrant une inhibition globale de l'infection par *Fusarium* entre 82% et 87%, quand leur application séparée leur confère des inhibitions de 15% et 38% respectivement (Yang et al., 2010).

6.5 - La lutte biologique

Durant la fin du XIX^{ème} siècle, une somme considérable de recherches a maintes fois démontré qu'un large panel de microorganismes appartenant à diverses origines phylogénétiques présentes des aptitudes à inhiber différents agents pathogènes. Ces aptitudes sont à la base de la lutte biologique.

La lutte biologique est définie par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) comme étant l'utilisation d'organismes vivants (appelés agents de lutte

Introduction générale

biologique, agents bénéfiques ou auxiliaires de cultures), ou de leurs produits, pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles (parasites, ravageurs et mauvaises herbes) (Sforza et Sheppard, 2004). Un engouement de plus en plus prononcé pour la lutte biologique s'est forgé avec la connaissance des effets néfastes des pesticides chimiques sur les écosystèmes et la santé humaine. De plus, les lois environnementales sont de plus en plus contraignantes et visent à réduire l'utilisation des pesticides dans l'agriculture conventionnelle, d'où l'intérêt croissant pour cette approche alternative qu'est la lutte biologique.

La lutte biologique est l'une des composantes de la lutte intégrée contre les organismes nuisibles. Cependant, la lutte biologique est aujourd'hui considérée plurielle car elle associe tous les moyens de lutte disponibles, chimique, biologique, mécanique, thermique, etc. Elle vise non pas à éradiquer les ravageurs, mais à maintenir leur population en dessous d'un seuil de nuisibilité plaçant les structures agricoles dans une situation économique supportable.

Au niveau de la rhizosphère et du contrôle des agents pathogènes telluriques, la lutte s'organise principalement autour de l'emploi de bactéries appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces* et *Pseudomonas*, et de champignons appartenant aux genres *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium* et *Trichoderma*. Leurs modes d'action peuvent être multiples. Deux termes sont parfois rencontrés dans la littérature pour les nommer:

- Celui de BCA, pour "BioControl Agent", est utilisé dans le cas où son action est directe sur l'agent pathogène (Avis et al., 2008).
- Celui de PGPM pour "Plant Growth Promoting Microorganism", est utilisé lorsque le micro-organisme a une action sur la plante. Ce terme se décline en PGP-F (Fungi) pour les champignons, PGP-Y (Yeast) pour les levures, PGP-B pour les bactéries et PGP-R pour les rhizobactéries.

Néanmoins, les agents de biocontrôle sont généralement à la fois BCA et PGPM, ce qui est le cas pour les *Trichoderma* spp. (Hermosa et al., 2012, Gajera et al., 2013).

Ces agents sont pour la plupart eux-mêmes telluriques. D'ailleurs, il s'avère que 1 à 10% des isolats du sol renfermeraient des souches aptes à développer un pouvoir antagoniste *in vitro*. Cependant, de ce nombre, très peu ont l'aptitude à inhiber naturellement des agents phytopathogènes dans un sol ou une plante. De même, un plus petit nombre encore serait capable d'inhiber un large spectre d'espèces pathogènes (McSpadden et al., 2002), d'où les nombreuses recherches très fouillées qui sont menées sur différents biotopes et cultures associées afin de caractériser un maximum de souches potentiellement bénéfiques en agronomie. Par conséquent, une bibliographie très dense décrit ces auxiliaires à travers leur diversité phylogénétique, mode d'application/introduction ou leur mode d'action sur leurs cibles par exemple. Dans ce manuscrit, nous ciblons notre propos sur le genre *Trichoderma*.

Quelles que soient les stratégies de lutte biologique employées (*i.e.* par inondation, conservation, introduction...), elles reposent sur des événements d'antagonisme entre organismes, comme pour ce qui concerne nos travaux de recherche entre *Fusarium solani* (le phytopathogène) contre *Trichoderma harzianum* (l'antagoniste). En écologie, le terme antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne hétérogène (Curl et Truelove, 1986). Par conséquent, l'emploi d'antagonistes a pour objectif de maintenir la population d'un organisme néfaste, au mieux de la diminuer significativement. A l'instar des interactions plante-

Introduction générale

microorganismes, les interactions tripartites (plante/pathogène/antagoniste) sont très complexes, quand bien même les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement déployés sont relativement universels. Les interactions menant au biocontrôle peuvent inclure l'antibiose, la compétition, la prédation tant au niveau de la rhizosphère qu'à l'intérieur de la plante. De même, peut être mise en jeu l'induction des mécanismes de défense de la plante (Benizri et al., 2001).

- *L'antibiose*, est liée à la production de métabolites toxiques par les microorganismes antagonistes qui agissent comme des antibiotiques en inhibant la croissance de l'agent pathogène. De nombreux champignons et bactéries sont producteurs de composés toxiques. Au sein du genre *Trichoderma*, l'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu qui repose sur la production de métabolites secondaires de natures diverses en exerçant un effet inhibiteur voir létal sur l'agent pathogène (Vinale et al., 2007-2014). A ce jour, près de 200 métabolites issus de *Trichoderma* spp. et appartenant à différentes classes de composés chimiques ont été répertoriés (Reino et al. 2008). Ils peuvent être classés en trois catégories : les composés volatiles, les composés diffusibles et les peptaïboles. Il est difficile de connaître les métabolites secondaires qui sont produits et actifs *in planta*. Certaines espèces de *Trichoderma* comme, *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. viride* produisent du 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) ; ce métabolite volatil jouerait un rôle dans la lutte biologique à l'égard de plusieurs champignons phytopathogènes dont *Fusarium oxysporum* (Jelen et al., 2013 ; Blaszczyk et al., 2014 ; Vinale et al., 2014). Parmi les mycotoxines produites par *Trichoderma harzianum*, ce même 6-pentyl- α -pyrone provoque des réductions de croissance mycélienne de 70% envers *Ralstonia solani*, et de 32% envers *Fusarium oxysporum*. De même, ce composé inhibe complètement la germination des spores de *Fusarium* (Scarselletti et Faull, 1994).

Enfin, agissant de manière synergique avec les mycotoxines, des enzymes hydrolytiques sont sécrétées par le genre *Trichoderma* et dégradent la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes. Parmi ces enzymes, figurent les chitinases, β -1,3-glucanases, cellulases, protéases et autres hydrolases. Ces enzymes, souvent associées aux activités mycoparasitaires du champignon bénéfique, font partie intégrantes des "métabolites" diffusibles impliqués dans le mécanisme général d'antibiose (Howell, 2003 ; Harman et al., 2004 ; Eziashi et al., 2006 ; De Castro et al., 2010).

- *Le mycoparasitisme*, se manifeste par l'attaque d'un champignon parasite sur un organisme hôte (ou proie), instaurant l'interaction dans un contexte nutritionnel direct (Gagné, 1984). Le comportement mycoparasitaire des champignons reste très complexe, et sera spécifiquement exposé dans le paragraphe 6.7 "Le mycoparasitisme".
- *La compétition*, traduit une notion de rivalité entre deux ou plusieurs microorganismes. Au niveau de la rhizosphère, la compétition est intense et s'exprime par la colonisation de la surface racinaire (Sivan et Chet, 1989 ; Reyes et al., 2004). Cette concurrence peut concerner la colonisation d'un espace, l'absorption d'éléments nutritifs (carbone, azote, fer, molécules organiques diverses etc) ou bien cibler des facteurs environnementaux qui deviennent limitant pour les pathogènes hôtes; ceux-ci n'ont alors plus la possibilité de se développer. Le genre *Trichoderma* est parmi les microorganismes

Introduction générale

rhizosphériques les plus compétitifs. Lors de la colonisation des racines, il tirerait profit de l'apport nutritif libéré par le système racinaire. L'activité de compétition s'établit généralement grâce à la production d'une large gamme de métabolites secondaires (Kim et al., 2004).

- *La potentialisation de la vitalité chez la plante infestée*, s'établirait grâce à deux événements : une stimulation des mécanismes de défense de la plante soit localement soit systémique, et une stimulation physiologique générale. Les auxiliaires, en contact avec les plantes, permettent à ces dernières de renforcer les mécanismes de défense des parties racinaires comme des parties aériennes (Yedidia et al., 2000). Ces défenses sont celles rencontrées lors de relations parasitaires de type incompatible, et rendent les plantes quasi résistantes à certaines maladies. C'est ce qui est communément appelé la résistance systémique induite (Systemic Induced Resistance, ou ISR). Les modalités fixant les relations parasitaires et les différents types de défense seront exposées dans le chapitre 6.8 "Interaction plante/pathogènes".

Quant au second événement, il se produit grâce à une meilleure absorption des nutriments (cuivre, fer, phosphore, manganèse ou sodium) fixés et non fixés dans le sol (Yedidia et al., 2001). En effet, plusieurs nutriments sont dits fixés par le sol (surtout s'il est acide), les rendant très difficilement assimilables par la plante. Cela concerne notamment le phosphate qui devient insoluble en se combinant au calcium ou au fer, et certains oligo-éléments (Fe^{2+} , manganèse etc). *Trichoderma harzianum* (T₂₂) est capable de rendre plus accessibles ces nutriments pour la plante. Cette accessibilité passe par leur solubilisation, généralement liée à la sécrétion de substances spécifiques qui réduit l'environnement (réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , etc). Les minéraux, comme le manganèse, jouent un rôle essentiel dans les défenses naturelles des plantes et dans la résistance contre les maladies. Cette potentialisation nutritionnelle pour la plante induit un second effet, la stimulation du système racinaire qui se matérialise par une accélération de la croissance du végétal. Par exemple, cette même souche de *Trichoderma* T₂₂ favorise le développement d'un système racinaire performant et sain, qui concrètement, se traduit par une production de biomasse plus élevée et donc une culture robuste et plus homogène. Cet effet est d'autant plus marqué lorsque les plantes croissent dans des conditions environnementales non optimisées.

Ces différents modes d'action ne sont pas exclusifs les uns des autres. Au contraire, ils peuvent coexister le plus souvent dans un même organisme. Mais qu'ils s'expriment individuellement, successivement ou en synergie, ils agissent de concert et concourent à l'efficacité de l'antagoniste. Par exemple, *Pseudomonas fluorescens* (à l'instar de *Trichoderma* T₂₂) présente plusieurs modes d'action : une compétition trophique en particulier pour le Fer et une antibiose vis-à-vis de l'agent pathogène, secondées par l'aptitude à induire de manière systémique la résistance de la plante (Alabouvette, 2004).

6.6 - Le mycoparasitisme

Dans la nature, les champignons évoluent au sein de communautés d'organismes. Ces communautés comprennent les plantes, les animaux et de nombreuses autres espèces d'organismes microscopiques dont les champignons. Au niveau du sol, dont chaque gramme

Introduction générale

hébergerait plus d'un million de micro-organismes, l'activité microbienne est remarquablement intense. Cette activité est d'autant plus explosive que les microorganismes évoluent au niveau des zones sous influence des racines, la rhizosphère. Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu très spécifique des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones etc.

Les relations qui s'établissent entre ces organismes sont très complexes en raison de leur grande diversité (indifférence, saprotrophisme, commensalisme, symbiose, ou parasitisme), mais surtout, de leur évolution possible au cours du temps. Dans un sol par exemple, la population des espèces parasitaires semble supérieure à celle des organismes non-parasitaires (Lafferty et al., 2008). La relation parasitaire, unilatérale et extrême, s'inscrit dans un contexte particulier : des champignons appartenant à des espèces différentes ou identiques et évoluant dans un même substrat rivalisent entre eux pour le contrôle de cette source nutritive, et la compétition peut devenir si agressive que certaines des espèces les plus compétitives se spécialisent pour devenir potentiellement parasites envers les espèces moins compétitives. Pourtant, quels que soient les modes de vie, ils se matérialisent par des mécanismes moléculaires quasi identiques. Par exemple, tous les champignons sécrètent des enzymes hydrolytiques (*i.e.* glucanases, chitinases etc) dans un substrat, mais ces enzymes permettent aux espèces saprotrophes d'exploiter des substrats morts, tandis que ces mêmes hydrolases permettent aux espèces pathogènes de pénétrer leurs hôtes animaux, végétaux ou même fongiques et d'en soutirer leur constituants moléculaires comme nutriments.

Dans un tel contexte d'interactions concurrentielles, il est souvent montré que des champignons agressifs peuvent agir comme des mycoparasites. Cette situation, limitée en réalité à une frange de la population fongique d'un écosystème donné, ne se manifeste pas exclusivement par l'appropriation des substrats en les puisant directement à l'intérieur d'un hôte. Ce détail est très important, car il montre la richesse des interactions mycoparasitaires qui existe dans la nature. C'est pourquoi de manière générale, à la place du terme mycoparasite celui de fongicole semble plus approprié car il couvre toute la gamme des associations qui s'établit entre les champignons qui cohabitent sur un même substrat, et ce quelle que soit la nature biologique de l'association (*i.e.* mycoparasitaire, antibiose, compétitions spatiale et/ou nutritionnel etc) (Gams et al., 2004). Cependant, l'usage du terme fongicole dans la littérature cache souvent la nature exacte des relations (c'est-à-dire des mécanismes d'appropriation de nutriments sur l'hôte) qui est soit inconnue soit très difficile à établir (Jeffries, 1995).

Stricto sensu, le mycoparasitisme se réfère spécifiquement au parasitisme d'un organisme (l'hôte) par un champignon (le mycoparasite). Ainsi, les champignons peuvent être mycoparasites de plantes, d'animaux etc. A un grain encore plus fin, ces champignons peuvent être mycoparasites d'espèces de champignons elles-mêmes pathogènes (ou parasites). Les mycologues exposent un tel phénomène en parlant d'hyperparasitisme. Dans certains ouvrages traitant de la lutte biologique, les hyperparasites sont également qualifiés de parasitoïdes.

Enfin, par analogie avec les agents pathogènes des plantes, les relations mycoparasitaires peuvent être décrites comme étant nécrotrophes ou biotrophes.

Introduction générale

Les parasites nécrotrophes envahissent leurs hôtes et s'en nourrissent en les tuant. Ces champignons se développent alors tels des saprotrophes, mais restent responsables du collapse des cellules de leur hôte. Ils incluent beaucoup d'Ascomycètes qui forment un grand nombre de spores asexuées (les "genres mitosporiques"), comme les espèces de *Glodadium* et surtout *Trichoderma*, ainsi que plusieurs espèces de Zygomycètes comme *Dicranophora* et *Spinellus*, ou l'Oomycète *Pythium*. De même, les nécrotrophes peuvent être classés sur la base des niveaux d'interaction qu'ils établissent avec leur hôte, c'est-à-dire:

- *Nécrotrophie de contact*, qui se manifeste par un contact physique entre les hyphes sans émission de tube de pénétration qui s'immiscent sous la paroi des hyphes de l'hôte. Ce cas concerne par exemple l'interaction *Cladosporium* qui provoquent la nécrose des basides du champignon pathogène *Exobasidium camelliae*, et ce sans pénétrer à l'intérieur des basides (Mims et al., 2007).
- *Nécrotrophie invasive*, qui se manifeste par une pénétration des hyphes de l'hôte par ceux du parasite. Par exemple, ces événements "d'invasion nécrotrophique" sont facilement observables sur des spores de champignons mycorrhiziens arbusculaires appartenant aux genres *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Sclerocystis* et *Scutellospora*. Ces champignons sont omniprésents dans la nature, et leurs spores peuvent être extraites facilement des sols par simple tamisage. De manière très intéressante, la plupart des échantillons tamisés contiendraient une proportion très significative voire quasi exclusive de spores parasitées. En effet, la paroi de ces spores est perforée par de nombreux canaux radiaux fins, causés par la pénétration de structures de pénétration et de suçoirs issus des hyphes de champignons mycoparasites. Ces champignons nécrotrophes par invasion peuvent être des Oomycètes tels *Spizellomyces* et *Pythium* ; des espèces qui sont d'ailleurs fréquemment observées mélangées parmi les spores mycorrhiziennes arbusculaires.

Les parasites biotrophes, établissent une relation souvent présentée comme "équilibrée", car elle se manifeste par la croissance du parasite sur un mycélium du champignon hôte qui est gardé en vie. La plupart des mycoparasites biotrophes appartiennent aux genres *Dispira*, *Dimargaris*, *Piptocephalis* et *Tieghemomyces* (des Zygomycètes). Fait intéressant, les biotrophes sont généralement difficiles à cultiver *in vitro*. Leur croissance optimale est assurée dès lors où ils croissent en culture double avec leur hôte. Enfin, les biotrophes peuvent être classés sur la base de la nature de l'interface hôte-parasite :

- *Les biotrophes intracellulaires* : ils pénètrent leur thalle dans le cytoplasme de l'hôte, et absorbent directement les molécules qui s'y trouvent (principalement observés chez les Chytrides et quelques Oomycètes).
- *Les biotrophes "haustoriaux"* : Ils forment une petite structure spécialisée, l'haustoria, qui se développe en différents points sur les hyphes du parasite, et qui perce la paroi de l'hôte pour y pénétrer sans épanchement cytoplasmique. Les membranes plasmiques des deux protagonistes rentrent en contact afin d'initier les échanges unilatéraux de nutriments.
- *Les biotrophes par fusion* (fusion biotrophique) : ils créent des cellules de contact spécialisées, qui s'enroulent autour des hyphes de l'hôte et dont les membranes cytoplasmiques fusionnent, réalisant une continuité cytoplasmique directe entre les

Introduction générale

hyphes du parasite et ceux de l'hôte. Ces événements cytologiques se manifestent par la création de fins pores dans les parois des hyphes, aboutissant à la formation de ponts spécialisés inter-hyphes. A la lumière de ces définitions, souvent très réductrices et difficilement applicables pour certaines associations, le confinement d'agents phytopathogènes au sein de plusieurs cultures peut être alors assuré par l'emploi d'agents microbiens dont les aptitudes hyperparasitaires s'exprimeraient d'emblée dans leur environnement naturel. En d'autres termes, ces hyperparasites peuvent jouer le rôle de "mycofongicides". Plusieurs souches de *Trichoderma harzianum*, hétérotrophes au carbone au comportement hyperparasitaire de type nécrotrophe invasif envers différents pathogènes fongiques, sont activement sélectionnées pour jouer un tel rôle protecteur.

6.7 - Les interactions plantes/pathogènes - généralités

Les interactions entre la plante et un agent pathogène impliquent des échanges d'informations, majoritairement moléculaires. Chaque protagoniste de l'interaction est capable de reconnaître l'autre, et d'adapter son métabolisme pour fournir les conditions favorables à l'expression de sa virulence (Thordal-Christensen, 2003 ; Alfano et Collmer, 2004). Parallèlement, la plante co-évolue afin d'identifier à l'aide de récepteurs des motifs moléculaires spécifiques de ces pathogènes. Ces événements de reconnaissance activent brutalement tout un réseau de communication intracellulaire permettant soit de renforcer les défenses constitutives soit de lancer la biosynthèse de nouvelles défenses prévenant alors la propagation du pathogène. Les qualités et spécificités de ces dialogues moléculaires entre les protagonistes inscrivent l'interaction soit dans un contexte de compatibilité (maladie) soit d'incompatibilité (résistance).

L'interaction incompatible est caractérisée par trois types de réponses défensives inductibles qui se succèdent de manière spatiotemporelle après l'infection initiale. La première est nommée réponse hypersensible (ou HR). Elle concerne les cellules en contact direct avec l'agent pathogène. Sauf exception, cette HR se concrétise par une production explosive de défenses, provoquant un collapse rapide des cellules. La deuxième est nommée résistance induite localement (LAR). Elle concerne les cellules contiguës de celles développant la HR. Elle se matérialise par l'accumulation également rapide de nombreuses défenses, mais les cellules restent vivantes. La LAR agirait comme une frontière défensive autour de la zone infestée (HR). Enfin, la troisième est nommée résistance systémique acquise (SAR). Elle correspond à la mise en place systémique des défenses sur le plant à distance du point d'infection, c'est-à-dire généralisée à l'ensemble des tissus de la plante. Selon les espèces, ces défenses généralisées persisteraient assez longtemps. Cependant selon le type d'élicitation, deux types de résistance systémique sont observées: la SAR (Systemic acquired resistance pour résistance systémique acquise) et la SIR ou ISR (resp. Résistance Systémique Induite ou Induced Systemic Resistance).

La SAR et l'ISR sont phénotypiquement similaires. Cependant, elles diffèrent par leurs voies d'inductions et les défenses mises en jeu. La SAR est directement déployée par la reconnaissance d'un pathogène avirulent, et ferait intervenir l'acide salicylique et des protéines liées à la pathogénicité (PR : Pathogenesis-Related Proteins). Quant à l'ISR, elle est stimulée par des agents non infectieux, les PGPM (Plant Growth Promoting Microorganism) qui sont souvent des endophytes. Les signaux hormonaux participant à l'établissement de l'ISR concerneraient plutôt les familles des jasmonates et l'éthylène, et des défenses de type phytoalexines.

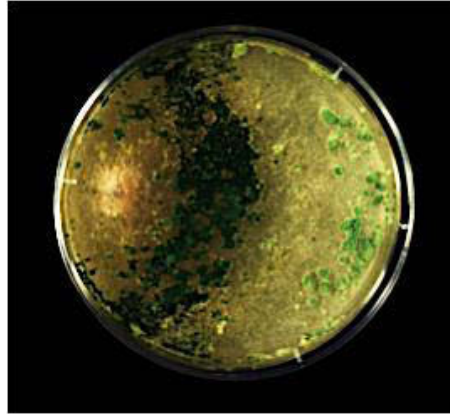


Figure 12. Aspect macroscopique de *Trichoderma harzianum* (souche *Ths97*, utilisée dans ces travaux de thèse) après 8 jours de culture sur milieu PDA.

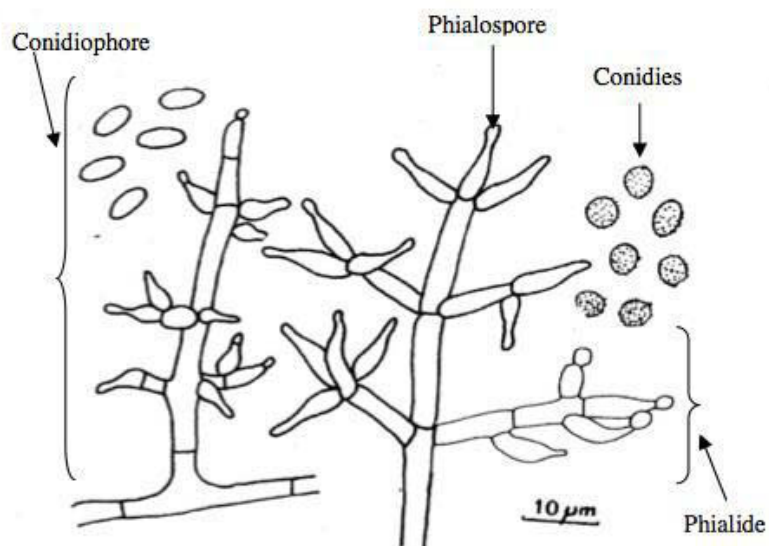


Figure 13. Structure microscopique de *Trichoderma* sp.

Introduction générale

A l'instar de n'importe quelle fonction physiologique, ces équilibres phytohormonaux sont pivots dans l'établissement des relations parasitaires. Les voies indépendantes de l'acide salicylique impliquent les voies de l'acide jasmonique et l'éthylène (voie JA/Et). L'infection par un pathogène biotrophe provoquerait principalement une activation des voies dépendantes de SA, tandis qu'une infection par un pathogène nécrotrophe, une blessure ou la reconnaissance d'un PGPM induiraient des réponses de défense impliquant les voies dépendantes aux équilibres JA/Et. Selon la contrainte, la composition des composés défensifs produits varie en fonction des voies mises en jeu. Cependant les équilibres phytohormonaux sont très subtils et complexes. Globalement, les voies dépendantes du SA semblent avoir une certaine priorité sur celles impliquant les équilibres JA/Et, avec de possibles inhibitions des réponses de défense induites par ces dernières (Pieterse et al., 2001 ; Spoel et al., 2003). Par contre, les voies JA/Et dépendantes auraient un effet positif (synergique) sur l'action des voies SA dépendantes. L'activation simultanée de la SAR et de l'ISR peut conduire à une résistance contre les maladies plus importante que chacune d'elle exprimée séparément (van Wees et al., 2000). Tandis que la SAR protégerait la plante sur plusieurs semaines contre de nouvelles infections (quel que soit l'agent pathogène), l'ISR ne conférerait qu'une protection totale sur quelques jours (Harman et al., 2004). Enfin, la durabilité de la résistance induite par les PGPM diffère d'une plante à l'autre mais aussi en fonction des souches de PGPM utilisées (Ramamoorthy et al., 2001).

L'ensemble de ces mécanismes de résistance (HR, LAR, SAR, ISR) déployés par les plantes permettent de se protéger contre un large spectre d'agents pathogènes de nature fongique, mais également bactérienne et virale, ou contre des ravageurs tels des insectes, des nématodes et des herbivores, ou encore, des phanérogames parasites.

7 - Les microorganismes bénéfiques, cas de *Trichoderma*

7.1 - Le genre *Trichoderma*, concepts généraux

Le genre *Trichoderma* est une moisissure appartenant à la classe des Sordariomycètes, et dont les membres sont généralement classés comme organismes anamorphes de la famille des *Hypocreae* de la division des Ascomycètes. La caractérisation de nouvelles espèces de *Trichoderma* ne cesse d'augmenter, rendant la taxonomie du genre *Trichoderma* très complexe. Cette classification, initialement basée sur des critères morphologiques au niveau des conidiophores et des phialides (Bisset, 1991 ; Leuchtmann et al., 1996), est continuellement bouleversée par le biais de la biologie moléculaire (Esposito et Silva, 1998 ; Chaverri et al, 2015). Quant à *T. harzianum*, l'analyse de séquences de gènes d'ARN ribosomiques (*ITS*), d'un facteur d'élongation (*EF-1alpha*), d'une calmoduline (*CAL*) et d'une actine (*ACT*) chez différentes espèces, a permis de prouver que *Trichoderma harzianum* était le téléomorphe (forme reproductrice sexuée) de l'Ascomycète *Hypocrea lixii* (Chaverri et al., 2003ab).

Les souches de *Trichoderma* sont avant tout identifiables par leurs aspects morphologiques caractéristiques, notamment grâce à leurs pigments conidiens verts clairs ou blancs et à leur structure de conidophores branchés (figures 12 et 13). La plupart ne présentent pas de cycle sexuel et leur cycle de développement ne présenterait que des phases de multiplication végétative par mitoses. Ces sporulations, abondantes, leur assurent un développement très rapide. Ce mode de vie est d'autant plus efficace que les organes de dissémination de *Trichoderma* sont capables de rester à l'état quiescent. Leur développement mycélien est stimulé lorsqu'une source d'énergie appropriée est disponible (Samuels, 2006). Les

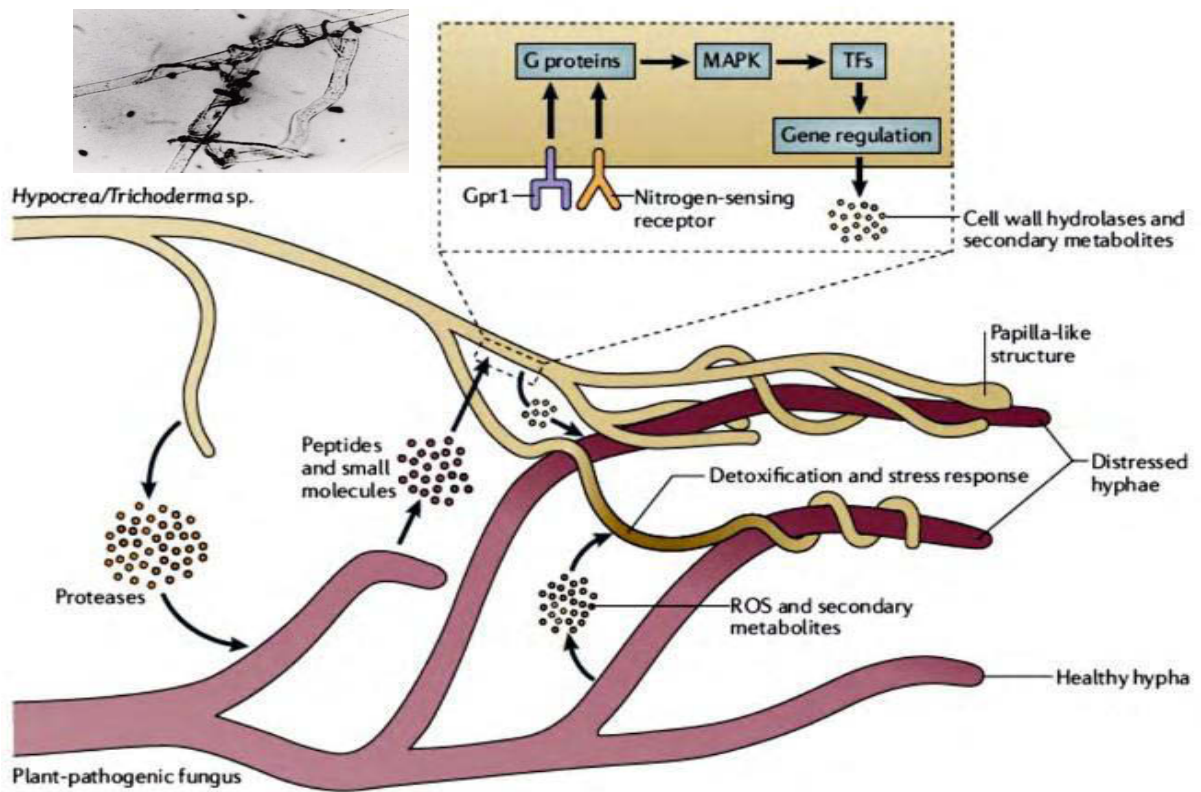


Figure 14. Mécanismes de mycoparasitisme exercés par les souches de *Trichoderma* (D'après Druzhinina et al., 2011).

Introduction générale

Trichoderma sont remarquables pour leur croissance rapide (avec un mycélium verdâtre en pleine croissance liée à la sporulation du champignon) et leur capacité à utiliser un large gamme de substrats d'origines naturelle ou chimique bien que leurs besoins nutritionnels semblent assez faibles.

Grace à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, les *Trichoderma* sont ubiquitaires et très répandus dans la nature, à l'exception notable de l'antarctique. Ils sont retrouvés dans des milieux écologiques très différents, terrestres comme aquatiques. En relation avec les plantes, les *Trichoderma* sont pour la plupart saprophytes et très rarement parasites, et vivent principalement associés aux racines ou sur des débris végétaux en décomposition (tout particulièrement dans la litière des forêts) (Howell, 2003). Enfin certaines espèces sont endophytes et colonisent les parties aériennes, les feuilles notamment. Au sein de la rhizosphère, le développement de plusieurs espèces de *Trichoderma* semble être favorisé par la présence d'un grand nombre de racines qu'elles colonisent aisément. Il a été démontré que la plupart des sols tempérés et tropicaux contiennent au minimum une centaine de propagules de *Trichoderma* par gramme du sol (Harman et al., 2004). De même, la présence des propagules de *Trichoderma* peut représenter jusqu'à 3% du total des propagules fongiques d'un sol forestier ou 1,5% des champignons dans des sols destinés au pâturage (Gams et Bissett, 1998). A ce titre, ils sont considérés comme des organismes majeurs dans l'équilibre des microflores où ils évoluent, et leur présence si prégnante associée à leur haute activité hydrolytique laisse sous-entendre qu'ils sont un maillon important dans la chaîne biologique.

7.2 - *Trichoderma* comme agent de lutte contre les phytopathogènes

Les propriétés antagonistes de certains *Trichoderma* spp. ont été mentionnées pour la première fois par Vuillemin en 1887 (cité dans Lamy Krafft et Roquebert, 1981). Du fait de la prise de conscience de la nocivité des pesticides, ils suscitent un intérêt grandissant. En effet, certaines souches de *Trichoderma* présentent l'aptitude à parasiter des champignons appartenant notamment à une très large gamme d'agents phytopathogènes (Chet, 1993). De plus, certaines souches établissent des colonisations vigoureuses et durables à la surface des racines de plants parasitées, en pénétrant l'épiderme ainsi que quelques couches cellulaires sous-épidermiques. Ce contact avec la plante instaure une relation très particulière entre les protagonistes, dont la plante tire un profit positif très significatif. Par conséquent, depuis les années 1930, certaines souches de *Trichoderma* ont été valorisées en tant qu'agents biologiques de protection efficaces pour contrôler certaines maladies fongiques et bactériennes chez les plantes (Harman et al., 2004 ; Dubey et al., 2007 ; Thangavelu et al., 2004 ; Hermosa et al., 2012 ; Sriram et al., 2013). Par exemple, sa présence *in planta* et en particulier au niveau des racines et des feuilles empêche le développement de certaines maladies parasitaires causées par *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Helminthosporium sativum* ou *Pythium ultimum*.

7.2.1 - Actions antagonistes directes déployées par *Trichoderma*

Ce n'est toutefois qu'en 1971 que Dennis et Webster ont pu élucider les différents mécanismes d'action de ce champignon antagoniste qui incluent principalement le mycoparasitisme, l'antibiose, la compétition pour les nutriments et l'espace, puis la stimulation des défenses et de la physiologie générale de la plante (Tseng et al., 2008). L'activité antagoniste de *Trichoderma*, quelles que soient ses modes d'action déployées, semble être un processus complexe. Lors d'une action directe (mycoparasitisme), plusieurs

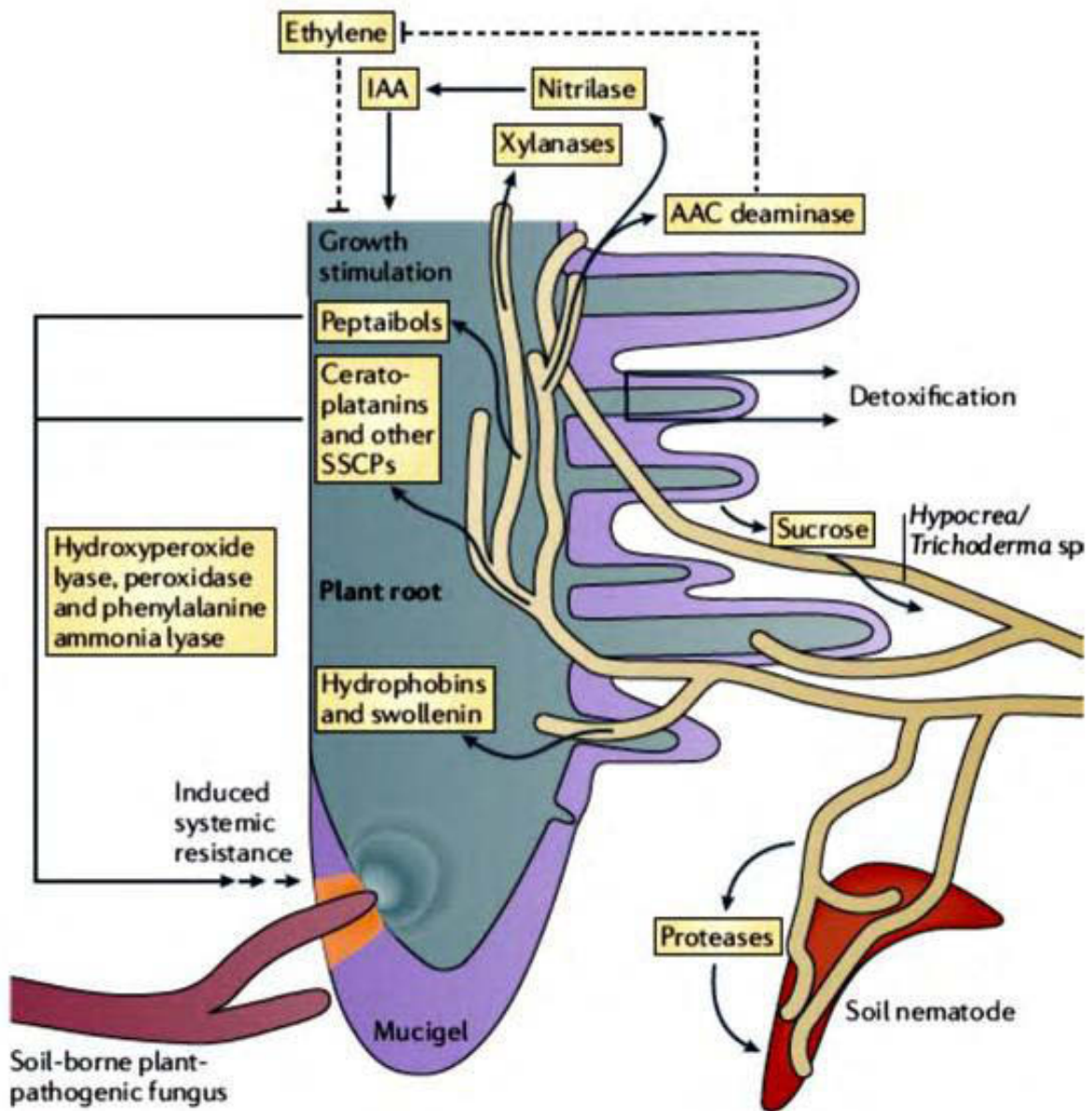


Figure 15 Mécanismes d'induction de la résistance systémique au niveau du système racinaire par *Trichoderma* (D'après Druzhinina et al., 2011).

Introduction générale

phases ont été décrites (figure 14). En premier lieu se déroule une croissance chimiotrope du parasite vers l'hôte. Il s'ensuit sa reconnaissance via un processus classique de type récepteurs/ligands. Ainsi les souches de *Trichoderma* reconnaissent leur cible par l'intermédiaire de petites molécules, notamment des fragments peptidiques, qui sont libérées sous l'action d'enzymes hydrolytiques sécrétées par *Trichoderma*. Ces molécules peuvent se lier à un récepteur couplé à une protéine G ou à des récepteurs Gpr1 qui se trouvent au niveau des membranes plasmiques des hyphes de *Trichoderma*. Cet attachement déclenche une cascade de signalisation impliquant des protéines G et des protéines kinases qui activeront à leur tour une série de MAPK. Ces voies de transductions modulent l'activité de facteurs de transcriptions, eux mêmes augmentant l'expression de gènes qui codent les enzymes impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires, ou d'enzymes de dégradation de la paroi appelées CWDEs (glucanases, chitinase, peptidases ...) (Kubicek et al., 2014). A ce stade, *Trichoderma* s'enroule autour du pathogène (processus décrit comme un étranglement), et son adsorption est assurée par des liaisons entre des glucides présents dans la paroi de *Trichoderma* et des lectines présentes dans la paroi du champignon parasité (Inbar et al., 1996). A l'instar de n'importe quel organisme vivant, l'agent parasité répond simultanément à l'attaque portée par *Trichoderma*, en sécrétant des métabolites secondaires volatiles ou dissouts et des poisons oxygénés (ROS, reactive oxygen species). Ces derniers élicitent une réponse de stress supplémentaire chez *Trichoderma*, concourant à la production d'enzymes et de nouveaux métabolites secondaires dédiés à leur détoxification (Druzhinina et al., 2011). *In fine*, ces interactions aboutissent à la dissolution du cytoplasme de l'hôte par injection de toxines et d'enzymes digestives qui le détruisent de l'intérieur. Les nutriments sont ensuite absorbés par *Trichoderma*, et orientés vers son métabolisme général. Ce mycoparasitisme est un mécanisme majeur de l'activité antagoniste de *Trichoderma* contre des agents phytopathogènes.

Le genre *Trichoderma* instaure également des situations de compétition envers les ressources en nutriments et l'espace à coloniser. Les *Trichoderma* sont parmi les microorganismes rhizosphériques les plus compétitifs. Ils tirent profit de l'apport nutritif libéré par le système racinaire des plantes avec la possibilité de coloniser ces racines. La pénétration des *Trichoderma* dans les tissus racinaires est généralement limitée au niveau de la première couche et/ou de la couche secondaire des cellules racinaires (Yedidia et al., 1999, 2000; Metcalf et Wilson, 2001). La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs "dissouts" dans la solution du sol comme le cuivre, le fer, le manganèse, le phosphore et le sodium (Yedidia et al., 2001).

Ces événements de compétitions sont généralement assortis à des sécrétions de toxines. En effet, les *Trichoderma* sont aptes à sécréter près de 200 métabolites secondaires appartenant à différentes classes de composés chimiques (Reino et al., 2008 ; Andrabi et al., 2011). Parmi ces composés, nous retrouvons des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (principalement contre les souches Gram +) et antiviraux. La nature des peptaïboles varie selon les espèces. Par exemple, *T. harzianum* sécrète des trichorzianines A et B et des trichorzines, *T. viride* sécrète les viridines, trichotoxines A et B, et des trichorovines, quant à *T. koningii*, il synthétise de la koningine, de l'acide koningique et des trichokonines. Certains de ces métabolites sont aussi nécessaires pour assurer des modifications chimiques de l'environnement (pH, ionisation etc). En synergie avec ces actions directes, *Trichoderma* instaure des actions indirectes comme la promotion de la

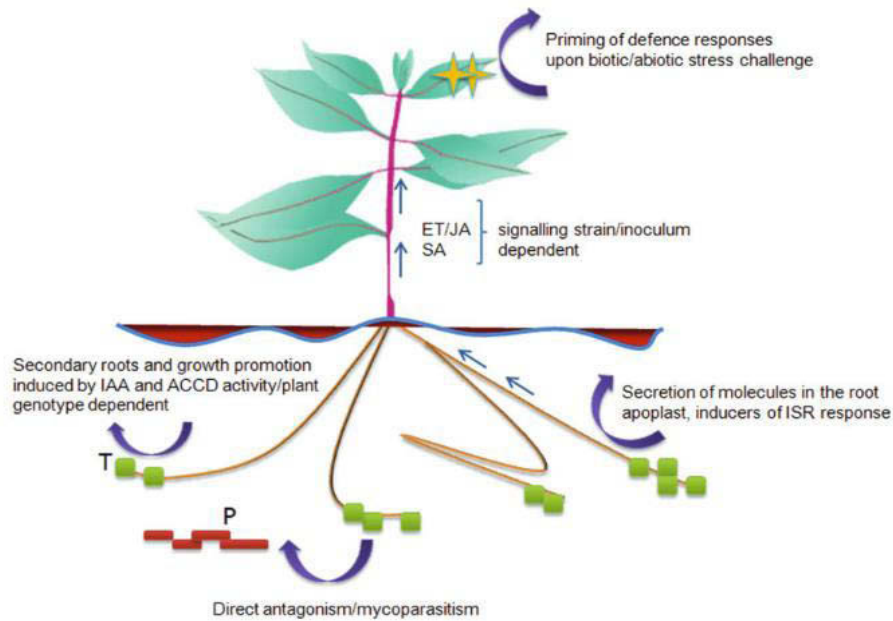


Figure 16. Représentation schématique des événements physiologiques chez la plante induits par les voies de signalisation déclenchées par *Trichoderma*. T, *Trichoderma* ; P, pathogène ; IAA, acide indole-3-acétique ; ACCD, l'enzyme ACC désaminase ; ET, éthylène ; JA, acide jasmonique ; SA, acide salicylique ; ISR, résistance systémique induite. (Hermosa et al., 2012).

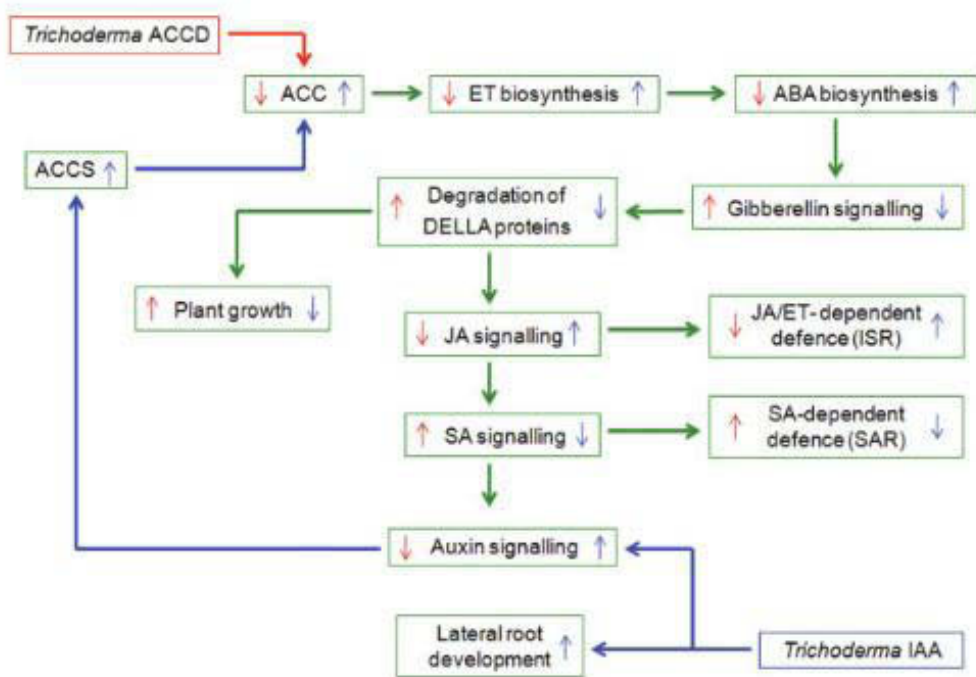


Figure 17. Effets de la production par *Trichoderma* d'ACC désaminase (ACCD) et d'acide indole-3-acétique (AIA) sur la plante. ABA, acide abscisique ; ACC, acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique ; ACCS, ACC synthéase ; ET, éthylène, ISR, résistance systémique induite ; AJ, acide jasmonique ; AS, acide salicylique ; SAR, résistance systémique acquise (Hermosa et al., 2012).

Introduction générale

croissance des plantes en accroissant la disponibilité en éléments nutritifs pour la plante, et une stimulation systémique des réponses de défense chez la plante (Naseby et al., 2000 ; Benítez et al., 2004 ; Vos et al., 2015). Ces actions ne sont pas exclusives les unes des autres ou spécifiques d'une espèce de *Trichoderma*, mais elles s'exécuteraient plutôt ensemble.

7.2.2 - Actions antagonistes indirectes, déployées par la plante sous la gouverne de *Trichoderma*

Parallèlement aux activités antagonistes directes, il a été démontré dans les années 90s que *Trichoderma* présente l'aptitude à moduler les résistances localisées et systémiques à l'égard de plusieurs agents pathogènes (Elad, 1996 ; Enkerli et al., 1999 ; Druzhinina et al., 2011) (figure 15).

Ces inductions chez les plantes sont assurées suite à la reconnaissance de substances chimiques sécrétées par les hyphes de *Trichoderma*. Différentes familles de molécules intègrent ces événements, dont des péptaïboles et le ceratoplatanin Sm1 (EPL1 chez certaines espèces), ou encore la Xylanase Eix, qui induisent la résistance chez les plantes notamment par l'activation des activités hydroperoxyde lyases, peroxydases et phénylalanine ammonia-lyases. Ces enzymes intègrent les voies de biosynthèse des composés des phénylpropanoïdes (ou phytoalexines) et de lignification des tissus, qui dans un contexte physio-phytopathologique, créent un environnement toxique tout en participant à la rigidification pariétale et au dépôt de callose qui freineraient la progression des agents phytopathogènes.

Enfin, d'autres effets positifs peuvent être mis en exergue, telles la résistance aux contraintes abiotiques des plantes, une amélioration de l'efficacité photosynthétique et une meilleure utilisation de certains minéraux du sol comme l'azote. Ces effets qui procèdent d'une manière synergique, seraient à l'origine d'une accélération de la croissance des plantes. En effet, des plants traités par *Trichoderma* présentent une forte augmentation du système racinaire (longueur et poids sec) et des feuilles (poids sec, longueur des pousses) (Harman et Bjorkman, 1998 ; Howell, 2003). Ces modifications physiologiques résulteraient d'une synergie entre plusieurs facteurs, dont une meilleure translocation de nombreux minéraux comme le cuivre, le fer, le manganèse ou le zinc qui peuvent être non disponibles dans certains sols ou bien existent sous des formes non assimilables pour les plantes, ou la modulation des équilibres entre des hormones végétales comme celles impliquées dans l'organogénèse et la stimulation des défenses végétales. Cette influence sur l'architecture générale du protagoniste végétal serait liée à l'aptitude originale que présentent les *Trichoderma* à synthétiser des molécules mimant les phytohormones comme des auxines et des cytokinines, ou alors des enzymes participant à leur biosynthèse comme l'ACC Désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) à l'égard de l'éthylène (Hermosa et al., 2012 ; Chanclud and Morel, 2016) (figures 16 et 17). Les équilibres hormonaux sont très complexes mais constituent les principaux leviers pour modifier l'expression des processus physiologiques d'un organisme eucaryote pluricellulaire. Et comme introduit dans le chapitre 5.8, le processus de développement et la modulation du système de défense de la plante sont interconnectés par un réseau de voies de signalisations hormonales dont les acteurs majeurs sont l'acide salicylique, les jasmonates et l'éthylène (Viterbo et al., 2010 ; Hermosa et al., 2012).

Introduction générale

Aujourd'hui, ces connaissances fondamentales sont valorisées et exploitées en agronomie afin d'optimiser le contrôle de certaines maladies chez des plantes cultivées. Ainsi, des souches de *Trichoderma* (sous forme de conidies, de mycélium et/ou de chlamydospores) ou des substances organiques produites à partir de ces souches sont commercialisées en Asie, en Europe ou aux États-Unis et appliquées sur un large éventail de cultures (Harman et al., 2004). Cependant, *Trichoderma* présente des mécanismes d'antagonisme globalement complexes. Il peut utiliser un ou plusieurs mécanismes d'action en synergie pour contrôler un champignon cible. De même, le déploiement des mécanismes varie selon les champignons cibles et les conditions environnementales (pH, température, humidité, etc). Une application de *Trichoderma* sera d'autant plus efficace qu'il est appliqué préventivement c'est à dire avant les premiers signes d'une quelconque infestation. Sa faculté à créer des manchons de protection autour des racines permet de prévenir toute entrée d'agent pathogène. Un effet positif similaire est observé lorsqu'il est pulvérisé sur les parties aériennes du végétal. De plus, comme décrit auparavant, l'installation de *Trichoderma* induit des effets stimulants pour la croissance d'une plante saine.

7.3 - Exploration de la relation pathosystémique et tripartite impliquant *Trichoderma* sous le prisme nutritionnel

L'interaction qui unit *Trichoderma* avec ses champignons hôtes dans un environnement physico-chimique très particulier, en l'occurrence celui d'une plante infestée, traduit avant tout l'établissement d'une relation trophique au profit de l'hyperparasite. Par définition et à l'instar de n'importe quel champignon hétérotrophe vis-à-vis de l'élément carbone, *Trichoderma* s'alimente aux dépens d'autres organismes vivants en y puisant par absorbotrophie (et essentiellement par osmotrophie, d'où la présentation des champignons parasites comme étant des agents osmotrophes) les ressources moléculaires nécessaires au maintien de la vie, autrement dit les aliments. A ce jour, l'appréciation de son cycle de développement sous un angle trophique (eau, minéraux et macromolécules) n'a pas été exhaustivement amorcée. Et pourtant, de telles données contribueraient à mieux comprendre fondamentalement le cycle de développement du champignon tout en alimentant les réflexions déjà engagées par différents laboratoires de recherche tunisiens et internationaux dans l'optimisation des moyens de lutte contre certains mycoparasites de l'olivier.

La composition chimique hydrophobe des membranes biologiques leur confère une imperméabilité vis-à-vis d'ions et de petites molécules organiques et inorganiques chargées. L'absorbotrophie est alors un mécanisme qui permet d'incorporer par diffusion transmembranaire et sans déformation de membranes une nourriture "dissoute". Cette diffusion s'organise au travers de tout un réseau complexe de canaux, de transporteurs, de pompes, de "translocateurs" situés au travers des membranes cytoplasmiques des hyphes. Ces transporteurs transmembranaires sont généralement spécifiques d'une ou de quelques molécules particulières, et facilitent leur circulation à travers les membranes cellulaires à l'aide de gradients de concentration chimiosmotiques (base de l'osmotrophie). Ce mode de nutrition ne peut être effectif que dans un environnement liquide, subséquent à la biosynthèse et la sécrétion d'enzymes extracellulaires qui catabolisent l'environnement organique du champignon.

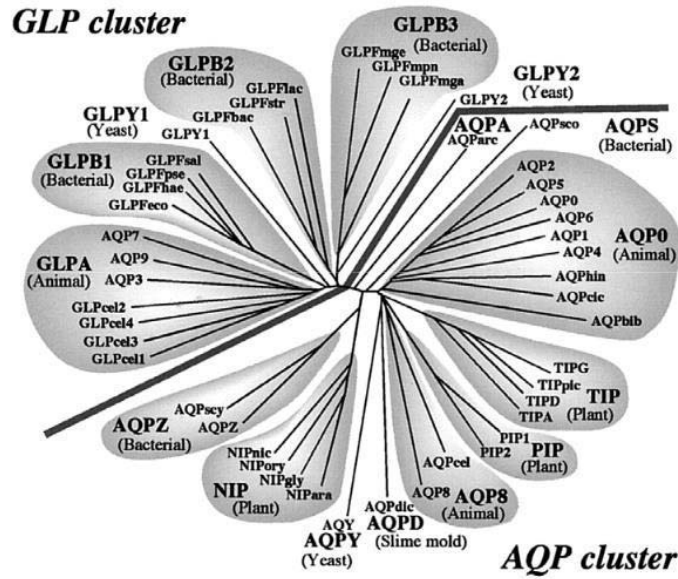


Figure 18. Classification phylogénétique des aquaporines. (D'après Heymann et al., 1999)

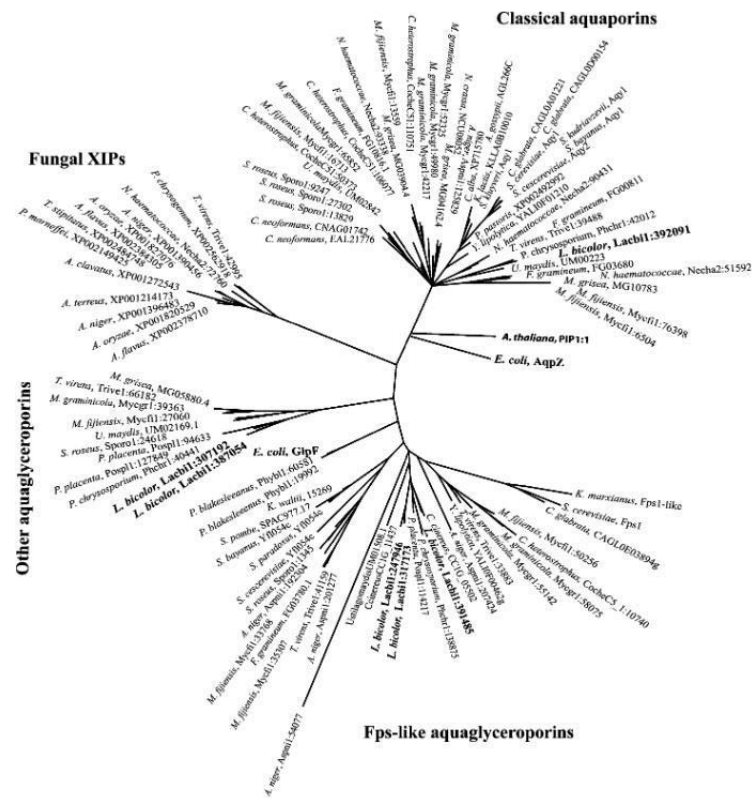


Figure 19. Relation phylogénétique des aquaporines fongiques. L'arbre phylogénétique a été enraciné en utilisant *Arabidopsis thaliana* PIP1; *Escherichia coli* AqpZ (un canal d'eau typique) et *E. coli* GlpF (un transporteur de glycérol). D'après Dietz et al., 2011.

Introduction générale

Il est impossible ici de dresser un éventail exhaustif des systèmes de transport qui déterminent les compositions moléculaires et les états d'énergie des cellules. Une étude récente avance que les cellules dans leur diversité se composeraient de plus de 10 000 systèmes de transport non redondants classés dans plus de 1 000 familles de transporteurs en fonction de leur phylogénie et de leur fonction. Autre chiffre traduisant l'intérêt que porte la communauté scientifique à ces transporteurs, les 11 000 citations de référence (Saier et al., 2016).

Chez les champignons, certaines familles sont relativement bien étudiées comme par exemple les "Major Facilitator superfamily" (MFS) ou les "Amino acid-Polyamine-organoCation (APC) superfamily" (Fajardo López et al., 2008 ; Lucic et al., 2008). Une superfamille, les "Major Intrinsic Proteins" (MIP), est comparativement moins étudiée. C'est pour cette raison que cette superfamille attire particulièrement toute notre attention.

8 - Les Major Intrinsic Protein (MIP)

8.1 - Concepts généraux

Les protéines intrinsèques majeures (MIP), encore appelées génériquement aquaporines (AQP), sont des canaux membranaires qui transportent de l'eau et/ou du glycérol retrouvés dans presque toutes les membranes biologiques, plasmalémique et intracellulaire (ou système endo-membranaire). De part leur répartition ubiquitaire dans un organisme et leur participation fonctionnelle à assurer l'échange de matière à travers ces membranes, les MIP sont impliquées dans la majorité des processus physiologiques de l'organisme.

La fonction principale des MIP est de faciliter le transfert bidirectionnel d'eau et de petits solutés à travers les membranes biologiques en réponse à des différentiels de gradients osmotiques. En fonction de leur perméabilité et de leurs caractéristiques structurales, c'est-à-dire selon leur aptitude à diffuser de l'eau exclusivement ou également du glycérol, les MIP sont classées en 2 principaux groupes distincts, respectivement les aquaporines (AQP *stricto sensu*) et les aquaglycéroporines (GLpF, glycerol-uptake facilitators, ou GLP) (figure 18).

8.2 - Les MIP fongiques

Les MIP sont partagées par la plupart des organismes procaryotes et eucaryotes (Danielson et Johanson, 2008). Chez les champignons, la classification MIP repose principalement sur celle des espèces de levures et applique la nomenclature des MIP de mammifères (Pettersson et al., 2005). Les MIP comprennent 3 sous-familles principales : les AQP orthodoxes (les aquaporines), les AQGP (aquaglycéroporines) et les XIP (X-Intrinsic proteins) (Dietz et al., 2011 ; Xu et al., 2013) (figure 19).

Historiquement, la première analyse phylogénétique complète de 19 levures et de trois champignons filamenteux (deux Ascomycètes et un Basidiomycète) (Pettersson et al., 2005) a permis de classer 55 MIPs fongiques en quatre groupes: les aquaporines orthodoxes, les aquaglycéroporines de type Fps-like, les aquaglycéroporines de type Yf1054c et des aquaglycéroporines de type "autres". Les protéines de type Fps1 ne sont rencontrées que dans les levures comme *Saccharomyces cerevisiae* et les AQGP "autres" seulement dans les champignons filamenteux. Quant aux protéines de type Yf1054c, elles sont partagées entre les levures et les champignons filamenteux

Introduction générale

La caractérisation fonctionnelle de la capacité de transport des MIP fongiques pour l'eau ou de petites molécules neutres a principalement débuté sur quelques MIP appartenant à six espèces de levures: *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis* et *K. marxianus*. Par la suite, Gupta et Sankararamakrishnan (2009) ont identifié neuf membres de type XIP à partir des séquences génomiques de huit espèces fongiques sur la base de la similitude de séquence avec quelques XIP végétales. A l'instar des plantes, il s'avère aujourd'hui que les XIP représentent la plus petite sous-famille MIP fongique. En dehors de quelques Ascomycètes et Basidiomycètes, les XIP ont été seulement observées chez quelques *Microsporidia*. Chez les Ascomycètes, les XIP ont été trouvées exclusivement dans la subdivision des Pezizomycotina, tandis qu'à l'intérieur des Basidiomycètes, les XIP semblent être absentes des Ustilaginomycotina (Nehls et Dietz, 2014). Enfin, cette sous-famille dont les fonctions des membres restent énigmatiques dans la physiologie du champignon, forment un groupe très particulier qui serait le seul à être en commun avec les plantes (Gupta and Sankararamakrishnan, 2009 ; Lopez et al., 2012). Enfin, par rapport aux AQP et AQGP, beaucoup reste à découvrir sur cette sous-famille.

Depuis quelques années, le nombre de séquençages des génomes de champignons est en pleine expansion, et les séquences sont souvent rendues publiques. De nouvelles séquences MIP sont donc accessibles et permettent d'enrichir et d'affiner les jeux de données phylogénétiques (Dietz et al., 2011 ; Xu et al., 2013 ; Verma et al., 2014). Par exemple, certains grands sous-groupes d'AQGP fongiques peuvent être classés comme α ou β , et sont rencontrés respectivement chez les Ascomycètes et Basidiomycètes (Xu et al., 2013). Il existe également deux petits sous-groupes fongiques d'AQGP désignés γ_1 et γ_2 . Le sous-groupe γ_1 se trouve principalement chez des espèces de Mucoromycètes. Le second groupe, γ_2 , a été récemment identifié et serait partagé entre quelques espèces filamenteuses d'Ascomycètes (Verma et al., 2014). Mais ces nouvelles données n'offrent que des ajustements mineurs car aucune nouvelle famille n'a été mise à jour ; les MIP fongiques semblent se disperser entre 3 sous-familles, les AQP, les AQGP et les XIP.

Les MIP fongiques sont donc diverses et se classifient en un grand nombre de clades qui se distinguent nettement de ceux rencontrés chez les animaux ou les végétaux (à l'exception notable des XIP). Contrairement à ces deux derniers règnes, très peu de MIP fongiques ont été analysées fonctionnellement. Cette carence s'adresse d'autant plus aux MIP issues de champignons filamenteux. Les MIP fongiques les plus étudiées furent celles de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le génome de cette espèce possède deux gènes AQGP, *Fps1* et *Yfi054c*, dont les protéines sont des perméases au glycérol fonctionnelles (Hohmann et al., 2000 ; Oliveira et al., 2003). *Fps1* joue un rôle clé dans l'osmorégulation de la levure en régulant les taux de glycérol intracellulaire lors de changements en osmolarité externe (Ahmadpour et al., 2014), alors que la fonction cellulaire de *Yfi054c* reste incertaine (Oliveira et al., 2003). Chez les champignons filamenteux, seules quelques MIP ont été étudiées, et en grande majorité au sein d'espèces mycorrhiziennes. L'AQGP GintAQPF2 de *Glomus intraradices*, membre du sous-groupe γ , a montré une activité élevée lorsqu'elle était exposée au polyéthylèneglycol et une grande aptitude à transporter l'eau, ce qui est crucial pour les cellules de levure transformées afin de survivre à une contrainte osmotique (Li et al., 2013b). De même, deux AQGP (Lacbi1:317173 et Lacbi1:391485) rencontrées chez le Basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria bicolor* et appartenant au sous-groupe α , montrent une perméabilité à l'eau plus importante que l'AQP orthodoxe Lacbi1:392091 (Dietz et al. 2011). Les AQGP Lacbi1:317173 et Lacbi1:391485 sont également aptes à transporter de

Introduction générale

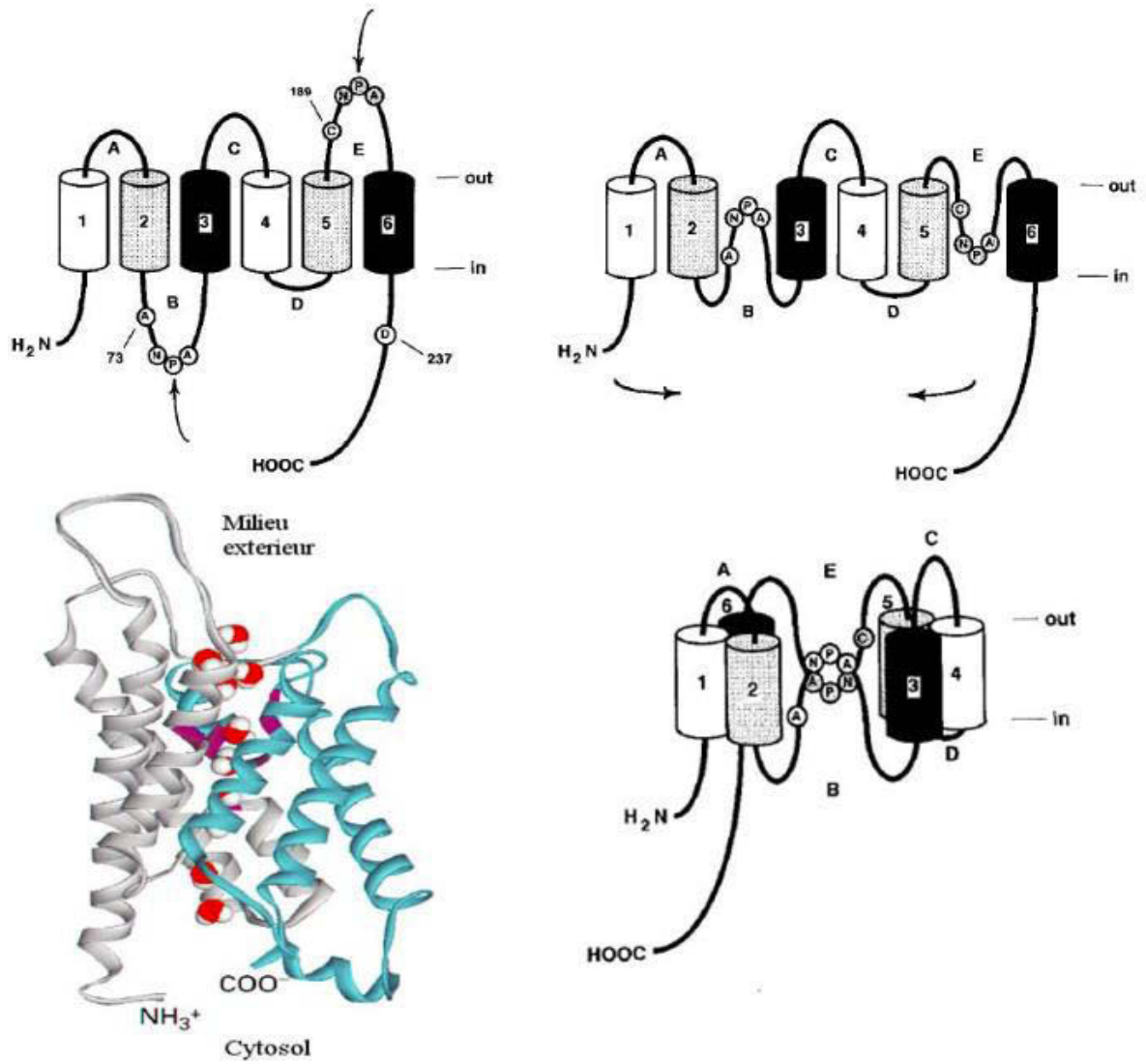


Figure 20. Modèle du sablier des aquaporines. D'après Isokpehi et al., 2009.

Introduction générale

l'ammoniac (en plus du glycérol pour Lacbi1:391485). Ces MIP participeraient aux échanges azotés primordiaux lors des relations unissant les plantes avec les symbiontes ectomycorrhiziens (Nehls and Dietz, 2014). Enfin, leur fonction dans les interactions plante-champignon incluraient la signalisation pendant l'établissement de la symbiose (Navarro-Ródenas et al., 2015) et le transport de l'eau dans les racines mycorrhiziennes (Xu et al., 2015).

8.3 – MIP et relation parasitaire

Comme nous l'expliquions précédemment, une frange du monde fongique est parasite, ou pathogène. Ces organismes tirent parti d'autres organismes vivants ou morts (ou hôtes). Leur installation engendre généralement des symptômes morbides (ou maladies) de tout ou partie de leur hôte, allant parfois jusqu'à provoquer sa mort. Ces parasites s'attaquent aussi bien aux plantes (comme par exemple la fusariose provoquée par les *Fusarium*), aux autres champignons (*Nyctalis asterophora* qui s'attaque aux russules et lactaires), aux insectes (*Beauveria* sp. utilisé dans la lutte contre le paludisme puisque parasitant les moustiques) et aux animaux dont les Hommes (*Aspergillus*, responsables des aspergilloses). De manière exceptionnelle, certaines espèces de champignons seraient décrites "carnivores", car elles seraient aptes à capturer et à digérer leurs proies, souvent des nématodes (Kerry, 2000).

Les études démontrant l'implication potentielle de MIP dans l'établissement de relations parasitaires sont exceptionnellement rares à la vue de la bibliographie foisonnante qui entoure les champignons parasites ou les MIP. Les quelques études disponibles les traitant ensemble ciblent essentiellement des interactions impliquant des espèces de protozoaires parasites comme *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania* (Fadiel et al., 2009 ; Beitz, 2005 ; Hansen et al., 2002), ou encore un groupe très particulier de champignons parasites unicellulaires rencontrés chez les animaux, les *Microsporidiomycota* (Verma et al., 2014). De manière attendue, ces MIP sont aptes à transporter de l'eau et/ou du glycérol. Mais de manière totalement remarquable, comme par exemple chez *Trypanosoma brucei*, certaines MIP montrent un filtre de sélectivité inhabituel avec une surreprésentation de grands résidus d'acides aminés hydrophobes de type IVLL, et l'absence systématique de résidus aromatiques et/ou chargés. Il s'avère que *T. brucei* provoque la maladie du sommeil chez l'homme, et que l'augmentation de sa résistance croisée aux médicaments mélarsoprol et pentamidine serait conférée par ces MIP particulières. En effet, ces molécules s'intégreraient dans le vestibule de certaines MIP en dépit leur imposante masse (>92 Da) comparée à celle du glycérol (33 Da) (Baker et al., 2012 ; Graf et al., 2013).

Chez les phytopathogènes, le champignon parasite du riz *Magnaporthe oryzae* renferme au moins 4 AQP orthodoxes et 2 AQGP. Trois de ces gènes semblent induits au niveau des structures d'infection, les appressoria. Il a été avancé que des efflux de glycérol provenant de ces appressoria seraient essentiels pour *M. oryzae*, car après avoir perforé la paroi cellulaire des cellules végétales, ces efflux éviteraient leur éclatement (Liu et al., 2015). En effet, l'accumulation de glycérol en tant que molécule osmoprotectrice semble être un événement essentiel dans les processus d'infection des cellules végétales (Thines et al., 2000).

Les études ciblant des MIP fongiques concernent avant tout aujourd'hui l'identification de nouvelles cibles médicamenteuses envers des espèces fongiques pathogènes pour l'humain, et dont une augmentation à résister aux médicaments est rapportée, probablement via une voie "d'excrétion/détoxication" dépendante des MIP (Agre et al., 2002 ; Kontoyiannis

Introduction générale

et Lewis, 2002 ; Sanglard, 2002 ; Castle, 2005 ; Beitz, 2005). A notre connaissance, et à l'exception d'une caractérisation de MIP chez le pathogène du riz *Magnaporthe oryzae*, aucune étude phylogénétique ou fonctionnelle n'a ciblé des MIP de champignons mycoparasites.

8.4 - Structure protéique, et détail de quelques points de régulation

La structure des MIP fut établie par des études de cristallographie aux rayons X sur des séquences animales, végétales et microbiennes. Ces études ont montré des caractéristiques structurales hautement conservées entre MIP (figure 20). En général, ces protéines sont de poids moléculaires moyens compris entre 23-35 kDa. Elles se composent de six régions transmembranaires (hydrophobes et hélicoïdales, numérotées de 1 à 6) ayant toutes une inclinaison d'environ 30° par rapport au plan de la membrane, et qui sont reliées entre elles par cinq boucles (A à E). Les boucles A, C, et E sont situées dans l'interface apoplasmique, tandis que les deux boucles B et D se situent dans l'interface cytoplasmique. Enfin, les MIP se terminent par deux régions N- et C-terminales, plus ou moins longues selon la MIP et l'espèce, qui évoluent dans l'interface cytoplasmique. Les six hélices transmembranaires se rassemblent entre elles, donnant naissance à une architecture globale d'un monomère en forme de canal. La sélectivité de ce canal vis-à-vis de tel ou tel soluté est notamment assurée par les boucles B et E. En effet, ces boucles présentent des séquences primaires en acides aminés globalement hydrophobes, les forçant à s'insérer vers l'intérieur du canal. De plus, ces séquences possèdent chacune un motif hautement conservé entre MIP et composé de 3 acides aminés: asparagine, proline et alanine (Asn-Pro-Ala, NPA). La très haute conservation de ce double triplet d'acides aminés en fait une des caractéristiques majeures des aquaporines. Ces motifs sont disposés de telle manière qu'ils se font face en configuration anti-complémentaire au cœur du canal. Ce cœur n'en reste pas moins un environnement globalement hydrophobe et, en empêchant l'établissement de liaison hydrogène, il permet le passage rapide des molécules polaires et/ou chargées (comme l'eau ou le glycérol). Ces motifs sont hautement stratégiques pour la fonctionnalité de la protéine, car ils participeraient à la création d'une zone de constriction dans le canal (tel un sablier) (figure 20). Chez AQP1 par exemple, le diamètre du pore passe de 20 Å environ au niveau de ses extrémités à 2,8 Å au point le plus étroit, soit au niveau de l'histidine 180. Dans un tel goulot d'étranglement, le passage se limite aux seules molécules d'eau suffisamment petites pour passer. Le passage des molécules se conçoit de manière orientée et en file indienne. Un pore plus conséquent permet le passage de molécules plus volumineuses comme le glycérol ; cela concerne les AQGP ou GLP.

Ces motifs ne sont pas les seuls à être responsables de la sélectivité des MIP. Ils sont secondés par différents résidus d'acides aminés disséminés le long de la séquence primaire. Par exemple, une seconde structure appelée filtre aromatique/Arginine (Ar/R) est composée de quatre acides aminés: un premier est situé dans l'hélice 2, un dans l'hélice 5 et les deux derniers au niveau de la boucle E inter-hélicoïdale contenant la seconde boîte "NPA". Cette seconde structure impose une constriction plus étroite que celle proposée par les motifs "NPA", et sa composition très variable en acides aminés serait en partie responsable de la capacité à transporter différents solutés (Mitani-Ueno et al., 2011). De plus, elle contribuerait aussi à l'exclusion protonique assurée par le filtre NPA.

Une fermeture du canal, occasionnant l'arrêt des flux de solutés, peut être obtenue par protonation d'un résidu Histidine situé au niveau de la boucle D. Cette boucle D se rabattrait

Introduction générale

sur le col, tel un couvercle, offrant une conformation fermée à l'aquaporine (Hedfalk et al., 2006). A l'inverse, un événement de phosphorylation au niveau de la boucle B agirait directement sur la boucle D, rendant une conformation ouverte à l'aquaporine (Hedfalk et al., 2006 ; Lopez et al., 2016).

Enfin, les AQP s'associeraient dans la membrane pour former des homo- et des hétéro-tétramères. Ces structures quaternaires seraient nécessaires pour le repliement, l'acheminement et la stabilité des protéines au sein des membranes. Fonctionnellement, chaque sous-unité est un canal entièrement opérationnel, mais certaines études ont révélé que cette configuration tétramérique augmenterait les activités de diffusion de chaque sous-unité.

9 - Conclusion

L'olivier s'enracine très profondément dans l'histoire de l'Humanité, et l'oléiculture à travers les siècles occupe toujours une place importante dans l'agriculture, l'économie et la culture de nombreux pays dont la Tunisie. Pour lutter contre les infections causées par de nombreux bioagresseurs, la production d'une olive de haute qualité nécessite cependant l'utilisation toujours trop importante de pesticides de synthèse chimique. La récurrence de ces traitements et des quantités appliquées posent le problème de leur impact sur l'environnement et la santé humaine (agriculteurs, transformateurs et riverains), mais également celui de leur présence insidieuse à travers de multiples résidus -souvent plus nocifs- dans les fruits ou dans l'huile touchant donc tous les consommateurs.

A l'instar de la plupart des espèces pérennes et annuelles cultivées, l'utilisation intensive de ces pesticides n'assure en rien la pérennité des plantations oléicoles. En effet, il a été exposé dans ce premier chapitre que l'olivier est la cible de nombreux agents phytopathogènes comme des agents cryptogamiques (*Fusarium* spp.) ou bactériens (*Pseudomonas syringae*) mais aussi de nombreux parasites tels les insectes (mouche), toutes ces maladies qui affaiblissent années après années l'arbre et son potentiel de production. Les épidémies de fusariose, tout comme celles décrites précédemment, progressent inexorablement au fur et à mesure du temps dans le paysage oléicole tunisien, voire méditerranéen. Toutes ces pathologies deviennent, en ce début de 21^{ème} siècle, une source d'inquiétude majeure pour la profession oléicole déjà fragilisée conjoncturellement.

Dans ce contexte, le biocontrôle par utilisation de micro-organismes bénéfiques doit être reconsidéré comme une stratégie de protection pertinente, et ce à plus d'un titre : parmi ses nombreux avantages, cette voie alternative aux fongicides protège la plante de manière non spécifique tout en potentialisant la robustesse de son état physiologique général. De plus il a été prouvé que la lutte biologique exerce un impact très faible sur les écosystèmes.

De même, le microorganisme bénéfique établit un dialogue avec ses partenaires. Le décryptage de ces dialogues moléculaires très complexes dans leur grande majorité peut servir de levier afin d'optimiser les relations engagées entre l'agent bénéfique et sa cible. Ces dialogues traduisent des situations d'attaque et de défense pour l'agent bénéfique comme pour sa proie, mais aussi l'établissement d'échanges trophiques entre les protagonistes. Dans ce second contexte, les MIP sont des acteurs majeurs impliqués dans les échanges de matière qui modèlent la vie ; il nous a paru très opportun et intéressant de les y étudier.

A partir de cet état de l'art, nous pouvons définir les objectifs et les démarches qui ont permis de structurer les travaux de cette thèse.

2

Chapitre



Objectifs et démarche

Objectifs et démarche

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre précédant souligne l'importance historique et culturelle de la filière oléicole en Tunisie. Elle met aussi en lumière l'urgence de développer une voie alternative à l'emploi des pesticides de synthèse chimique pour assurer une production d'olives rentable mais fragilisée par de nombreuses maladies, dont la fusariose.

Tandis que certaines de ces maladies sont relativement bien décrites et étudiées fondamentalement chez l'olivier, les données traitant de la fusariose (étiologie, mécanismes moléculaires de l'interaction etc) restent très fragmentaires voire inexistantes.

Durant ma thèse, nous avons voulu répondre à une hypothèse centrale : l'agent *Trichoderma harzianum* peut-il être considéré comme un micro-organisme bénéfique capable d'exercer une activité de biocontrôle contre l'agent phytopathogène *Fusarium solani* chez l'olivier? Les champs exploratoires de cette hypothèse peuvent être appréhendés au travers de directions et de méthodologies très diverses. Pour ce qui nous concerne, nous avons ciblé nos actions en tentant de répondre à deux grandes questions de physio-phytopathologie moléculaire, chacune correspondant à un chapitre qui sera développé dans le manuscrit :

Question 1 - *T. harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *F. solani* chez l'olivier ? Cette question cible le caractère protecteur qu'une souche de *Trichoderma harzianum* puisse avoir envers une souche de *Fusarium solani*, deux souches fongiques qui sont issues de terrains agricoles tunisiens. Différentes actions ont donc été mises en œuvre : i) Evaluation des niveaux de protection que *T. harzianum* apporterait sur de jeunes plants d'olivier inoculés par une souche particulière de *F. solani* ; ii) Suivi des niveaux d'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'immunité fondamentale des plants d'olivier et potentiellement induits par *T. harzianum* ; iii) Décryptage *in vitro* des mécanismes d'attaque que déploierait *T. harzianum* en contact avec *F. solani*.

Question 2 - *Les MIP sont-elles impliquées dans les relations trophiques de T. harzianum ?* Cette seconde question cible donc spécifiquement le réseau trophique que *T. harzianum* établit avec son environnement, *in planta* (olivier) ou *in vitro* (milieu artificiel), et en présence ou non de son champignon hôte *F. solani*. Quelles que soient ces situations physiologiques, elles s'inscrivent dans des événements trophiques, et bien que les champignons osmotrophes se nourrissent par diffusion transmembranaire de produits de digestion extracellulaire, les données ciblant les mécanismes moléculaires sous-jacents sont très complexes et ne traitent pas de l'ensemble des perméases qui peuvent être mises en jeu. Dans cette seconde partie, nous étudions l'implication de la famille de perméases transmembranaires appelée Major Intrinsic Protein (MIP). A l'instar de la première question, quatre actions ont été menées : i) Evaluation de la diversité des MIP au sein du genre *Trichoderma* (et *Fusarium*) en comparaison avec la diversité des MIP déjà décrite au sein de certains clades fongiques (données bibliographiques) ; ii) Evaluation des profils d'expression transcriptionnelle des MIP en situation d'installation des champignons sur olivier et lors d'événement de mycoparasitisme ; iii) Caractérisation *in silico* des éléments régulateurs *cis* composant les promoteurs des MIP de *Trichoderma* exprimées dans les conditions physiologiques ciblées ; iv) Elaboration de la structure tridimensionnelle de MIP appartenant aux grands sous-groupes identifiés préalablement, et identification de points de régulation majeurs pouvant prédire la fonction de perméase vis-à-vis de quelques solutés (eau, glycérol etc).

Objectifs et démarche

Les résultats de ces actions sont présentés dans deux articles qui constituent les chapitres 3 et 4 de la thèse. Le premier, intitulé "Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain *Ths97* in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees", est publié dans la revue *Biological Control*. Le second, intitulé "MIP diversity from *Trichoderma* : structural consideration and transcriptional modulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* in olive trees" a été acceptée pour publication dans la revue *Plos one*.

Chaque question se terminera par une synthèse des données les plus marquantes et de leur discussion. Les réponses que nous proposerons permettront d'avancer (1) dans la conception de moyens de lutte biologique contre la fusariose, notamment par l'utilisation de souche de *T. harzianum* ; (2) dans la compréhension des mécanismes déployés par *T. harzianum* en situation de biocontrôle envers *F. solani*, et (3) dans la compréhension de la superfamille des MIP qui reste très peu étudiée chez les champignons par rapport aux autres règnes, animaux et végétaux. L'ensemble de ces données sera résumé dans un schéma global de l'interaction tripartite [olivier-*T. harzianum*-*F. solani*].

Bien que répondant aujourd'hui à des questions fondamentales de (physio)phytopathologie moléculaire, cette thèse répond également à des problématiques de contrôle biologique de la fusariose touchant une grande culture arboricole tunisienne, l'oléiculture. Ainsi cette thèse s'intègre pleinement dans une démarche plus large et finalisée d'optimisation de moyens de luttes alternatifs aux pesticides. Dans ce cadre, le mémoire se conclura sur quelques perspectives de recherche.

Quelques dernières précisions

L'aspect cotutelle de cette thèse m'a offert un environnement propice pour l'épanouissement et la réussite de ce sujet de recherche. Par exemple, les expérimentations d'inoculation sur plants d'olivier ont été entreprises en Tunisie sous la responsabilité de Dr TRIKI, et les analyses moléculaires ont été réalisées au sein de l'UMR PIAF à l'Université Clermont Auvergne. De même, nous avons fait appel à l'expertise de M. AUGUIN Daniel, structuraliste moléculaire des protéines et qui est positionné à l'Université d'Orléans, pour affiner nos modèles tridimensionnels des MIP exprimées chez *Tichoderma harzianum*.

Par ailleurs, au début de ma thèse, j'ai pu participer à une étude sur les X-intrinsic Protein (XIP) chez l'Hévéa. Cela m'a permis de me familiariser avec les outils de la transcriptomique. D'ailleurs, l'ensemble des travaux réalisés sur ces XIP d'Hévéa a fait l'objet d'une publication intitulée "The *Hevea brasiliensis* XIP aquaporin subfamily: genomic, structural and functional characterizations with relevance to intensive latex harvesting" et publiée dans la revue *Plant Molecular Biology*, dans laquelle je figure parmi les auteurs. À ce titre, l'article est inclu parmi les annexes du chapitre 7.

Enfin, nous précisons qu'il n'y a pas de chapitre spécifiquement réservé à la description des matériels et des méthodes employés durant ma thèse pour mener à bien nos travaux de recherche. Les méthodes d'étude étant très spécifiques de chacune des 2 questions abordées, leurs descriptions sont englobées dans chacun des chapitres les exploitant (ie 3 et 4).

3

Chapitre



Question 1

Trichoderma harzianum a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier ?

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

Préambule

Une recherche d'agents cryptogamiques a été menée dans le sol de champs de culture d'oliviers. Une souche de *Fusarium solani* a été isolée et enregistrée *Fso14* (Dr Mohamed Ali TRIKI, résultat non publié, Institut de l'Olivier, Université de Sfax, Tunisie). Il s'avère que cette souche exprime une forte agressivité sur la plupart des cultivars d'olivier, et serait incriminée dans l'apparition d'importants dégâts au niveau de différentes productions agricoles, y compris l'oléiculture. Nous avons décidé d'exploiter cette souche *Fso14*. Mais dans la mesure où nous entreprenons nos expérimentations sur le cultivar Chemlali qui est largement répandu dans les oléicultures en Tunisie, il était au préalable important de vérifier sa sensibilité envers *Fso14*. En d'autres termes, il était crucial que cette souche réponde au postulat de Koch, c'est-à-dire que le lien de causalité qu'unit l'agent phytopathogène aux symptômes qu'il provoque soit clairement établi. Ainsi, *Fso14* isolée de plants malades et à nouveau inoculée sur de jeunes oliviers Chemlali sains induit sur ces derniers les symptômes de dépérissement attendus. Le test étant positif, la souche *F. solani Fso14* fut utilisée pour les expérimentations prévues.

Différentes approches de lutttes sont envisageables pour protéger les cultures des fusarioses (Fernanda et al., 2012). Encore actuellement, les agriculteurs ont largement recours à l'emploi des méthodes chimiques (Avasthi et al., 2010 ; Paster et Barkai-Golan, 2008). Cependant, l'utilisation excessive de ces fongicides dans le contrôle des champignons mycotoxigéniques reste onéreuse pour la profession oléicole, et entraîne d'importants dommages environnementaux, écologiques et de santé publique. De plus, si ces traitements offrent globalement une protection efficace contre les maladies fongiques, elle reste de courte durée. En effet, leur efficacité est relativement peu durable à cause de l'adaptation rapide des populations de phytopathogènes qui se traduit par le développement de résistance (Paster et Barkai-Golan, 2008 ; Raja, 2014). Ces faits ont notamment conduit à mener une réflexion plus percutante sur la valorisation de lutttes alternatives aux fongicides. Le biocontrôle s'inscrit pleinement dans cette remise en question, et passe par l'utilisation d'organismes vivants bénéfiques (BCA) parmi lesquels figurent des espèces du genre *Trichoderma*. À ce jour, aucune information ne semble indiquer que des *Trichoderma* spp. puissent protéger des plants d'olivier contre le développement de fusarioses.

À la lumière de ce manque d'information et tenant compte des enjeux environnementaux et sociétaux d'une telle lutte, nous avons voulu vérifier l'hypothèse qu'une souche de *Trichoderma* puissent stopper la virulence de l'agent de la fusariose sur olivier. Une très large gamme de souches de *Trichoderma* était à notre disposition. Aussi, il nous a semblé opportun de cibler une souche naturellement présente dans les sols agricoles tunisiens, en l'occurrence la souche de *T. harzianum Ths97* (Triki et Priou, 1997). En effet, nous sommes convaincus que l'utilisation d'espèces bénéfiques indigènes en lutte biologique contribue à préserver non seulement l'équilibre des agrosystèmes, mais aussi de leur potentiel de rendement. L'effet antagoniste de cette souche fut alors testé de manière préventive et curative sur des jeunes plants d'olivier Chemlali exposés à l'agent de la fusariose, *F. solani Fso14*. Sur ces mêmes plants, l'expression de plusieurs gènes intégrant différentes voies de défense végétale fut analysée : le stress oxydant, la voie des phénylpropanoïdes, des PR protéines, et des enzymes et facteurs de transcriptions impliqués dans l'établissement des équilibres phytohormonaux de la plante. Enfin, des tests *in vitro* ont été entrepris afin d'apporter quelques faisceaux d'indices quant aux mécanismes cellulaires que déploierait *Ths97* envers son champignon hôte *Fso14*.

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

Biological Control

Biological Control 110 (2017) 70-78.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.008>.

***Beneficial effect of Trichoderma harzianum* strain *Ths97* in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees**

Maroua Ben Amira^{a,b,c}, David Lopez^a, Ali Triki Mohamed^c, Ali Khouaja^b, Hatem Chaar^d, Boris Fumanal^a, Aurélie Gousset-Dupont^a, Ludovic Bonhomme^e, Philippe Label^a, Pascale Goupil^a, Sébastien Ribeiro^a, Valérie Pujade-Renaud^{a,f}, Jean-Louis Julien^a, Daniel Auguin^g, Jean-Stéphane Venisse^a

^aUCA, INRA, UMR PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^bNational Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka, Tunisia

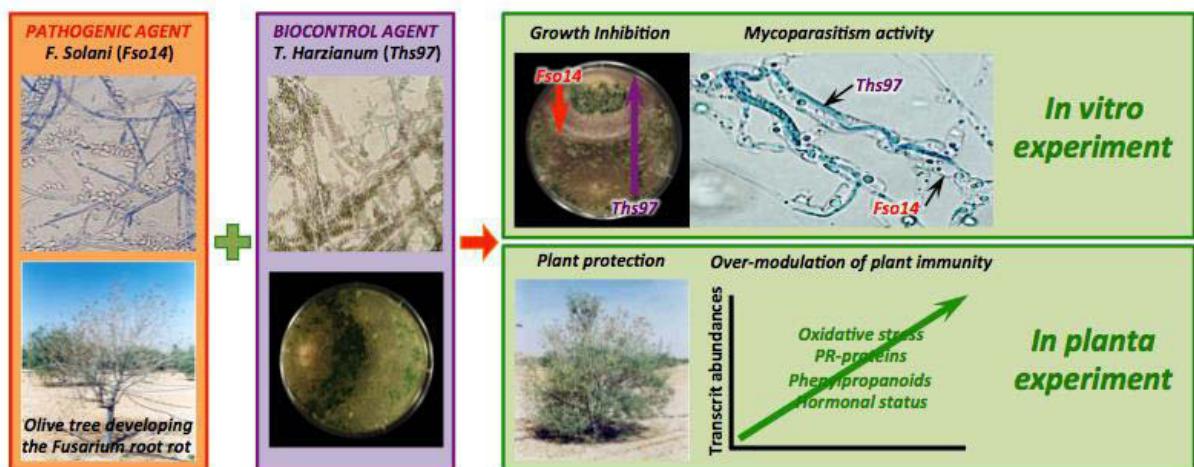
^cInstitut de l'Olivier, LR: Amélioration et Protection des Ressources Génétiques de l'Olivier-Université de Sfax, Tunisia

^dNational Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Crop Improvement Laboratory, INRAT, Tunisia

^eUCA, INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^fCIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^gUniversité d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, INRA-USC1328, F-45067 Orléans, France



Biocontrol potential of the agent *Trichoderma harzianum* (strain *Ths97*) against the causative pathogenic agent of fusarium root rot in olive trees, *Fusarium solani* (strain *Fso14*).

- Biological control efficacy of *T. harzianum* *Ths97* on *F. solani* *Fso14* was tested.
- *Ths97* inhibited *Fso14* growth *in vitro*, and exhibited mycoparasitic activity.
- Dual inoculation of *Ths97*/*Fso14* increased olive tree protection against Fusarium rot.
- *Ths97* stimulated local defense machinery in olive tree roots.
- *Ths97* Preventive application primed olive trees by potentiating its innate immunity.



Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain *Ths97* in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees



Maroua Ben Amira^{a,b,c}, David Lopez^a, Ali Triki Mohamed^c, Ali Khouaja^b, Hatem Chaar^d, Boris Fumanal^a, Aurélie Gousset-Dupont^a, Ludovic Bonhomme^e, Philippe Label^a, Pascale Goupil^a, Sébastien Ribeiro^a, Valérie Pujade-Renaud^{a,f}, Jean-Louis Julien^a, Daniel Auguin^g, Jean-Stéphane Venisse^{a,*}

^aUCA, INRA, UMR PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^bNational Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka, Tunisia

^cInstitut de l'Olivier, LR: Amélioration et Protection des Ressources Génétiques de l'Olivier-Université de Sfax, Tunisia

^dNational Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Crop Improvement Laboratory, INRAT, Tunisia

^eUCA, INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^fCIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^gUniversité d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, INRA-USC1328, F-45067 Orléans, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Trichoderma
Fusarium root rot
Biocontrol
Mycoparasitism
Priming
Plant defenses

1. Introduction

Olive trees (*Olea europaea* L.) are one of the most ancient domesticated fruit trees in the Mediterranean basin, and remain a fruit crop of interest worldwide. There is currently an increase of olive tree orchards worldwide, due to both their resilience to climate change, and also a larger demand for olive oil. However, like any plant species of agronomical interest, olive trees are subject to severe attacks from a variety of pathogens that affect their health, and ultimately their yield and oil organoleptic quality (Triki et al., 2009; Boulila, 2011; Gharbi et al., 2016). An increased incidence of drying syndromes has been observed, especially in some young olive tree orchards and in nurseries. They result in partial wilting and sudden death of young trees. In all of the countries where olive trees are grown, a number of fungi have been reported to be associated with root diseases in nurseries and new orchards. In Tunisia, preliminary studies were carried out on related mycoflora from symptomatic olive plants in different oil-producing

regions. One of several potential soil-borne pathogens, a new strain of *Fusarium solani* (*Fso14*), was isolated. This strain is known to be responsible for fusarium root rot disease, and was the focus of this study.

The *Fusarium* genus is presented as a cosmopolitan soil saprophyte, but it includes some of the most aggressive phytopathogen species (Dean et al., 2012). Under certain environmental conditions, strains can become facultative biotrophic parasites, causing cortical decay, root rot, and leaf yellowing and wilting, and ultimately, the premature death of the infested plants (Coleman, 2016). Regarding olive trees, variations in pathogenicity of different *Fusarium* spp. isolates have been reported, and *F. solani* was described as one of its most aggressive pathogens (Barreto et al., 2001; Trabelsi et al., 2016). Despite substantial economic losses caused by *F. solani*, disease control is still limited to systemic fungicide treatments and prophylactic actions. Both measures seem to be very limited (Chandel and Deepika, 2010). They become rapidly ineffective in controlling phytopathogens under conditions

* Corresponding author at: Campus Universitaire des Cézeaux, 8 Avenue Blaise Pascal, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France.

E-mail addresses: marouabenamira@gmail.com (M. Ben Amira), lopez.dav@icloud.com (D. Lopez), trikimali@yahoo.fr (A. Triki Mohamed), alikhouaja@yahoo.fr (A. Khouaja), chaarh@yahoo.com (H. Chaar), boris.fumanal@uca.fr (B. Fumanal), Aurelie.Gousset@uca.fr (A. Gousset-Dupont), ludovic.bonhomme@uca.fr (L. Bonhomme), philippe.label@clermont.inra.fr (P. Label), pascale.goupil@uca.fr (P. Goupil), sebastien.ribeiro@uca.fr (S. Ribeiro), valerie.pujade-renaud@uca.fr (V. Pujade-Renaud), j-louis.julien@uca.fr (J.-L. Julien), auguin@univ-orleans.fr (D. Auguin), j-stephane.venisse@uca.fr (J.-S. Venisse).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.008>

Received 12 January 2017; Received in revised form 7 April 2017; Accepted 10 April 2017

Available online 12 April 2017

1049-9644/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

conducive to disease and raise serious environmental and safety concerns. In addition, these measures could quickly become ineffective in controlling phytopathogens, with risks of resistant strains emerging (Saiz-Jimenez et al., 2012). The latest surveys conducted in the highest olive-producing areas portray a scenario where the disease is steadily expanding (Sergeeva, 2011). For these reasons, it is crucial to intensify efforts to develop alternative agricultural management practices that could replace chemicals to biologically control *F. solani* on diseased olive plants, thereby acting in a sustainable and environmentally friendly way. One such alternative requires biological control agents (BCAs) that reduce the amount of inoculum and/or disease-producing activity of pathogens (Cook, 1993). So far, however, few detailed scientific studies have been carried out on the efficient protection of olive trees against *Fusarium* spp. through the use of BCAs belonging *inter alia* to the *Trichoderma* genus.

Several rhizocompetent filamentous fungus *Trichoderma* spp. are now attractive biofungicide agents, able to control various plant pathogenic fungi. *Trichoderma* is synergistically beneficial by competing for space and nutrients, and inhibiting and/or parasitizing off pathogens using highly fungitoxic antibiotics (Vinale et al., 2014) in combination with extracellular cell wall-degrading enzymes (CWDEs) (Qualhato et al., 2013). In addition, *Trichoderma* spp. exhibits biostimulating abilities, inducing plant resistance mechanisms and root development and plant growth (Lorito et al., 2010). Locally and systemically inducing plant defenses is currently viewed as the pivotal mechanism by which *Trichoderma* spp. diminishes plant disease symptoms at the root and foliar levels. These modulations in host plant's resistance (also called ISR, Induced System Resistance) result in a superficial and long-lasting *Trichoderma* colonization of root tissues (Shoresh et al., 2010; Hohmann et al., 2012). These plant-mediated responses may begin because elicitors originating from *Trichoderma* itself are recognized, or due to the hydrolytic activity on its prey (Djonovic et al., 2006; Monteiro and Ulhoa, 2006). They are usually regulated and relayed by jasmonic acid (JA)- and ethylene (ET)-dependent signaling pathways (Pieterse et al., 2009). However, the complex underlying molecular mechanisms in the *Trichoderma*-induced resistance have only been partially revealed and understanding them is highly difficult. It is assumed that the plant recognition of *Trichoderma* triggers the activation of a cascade signal which then in turn activates a variety of defense responses, including the secretion of antimicrobial reactive oxygen species (ROS), numerous secondary metabolites such as phytoalexins and pathogenesis-related proteins, callose depositions and the possible development of a type of programmed cell death (PCD) known as hypersensitive response (HR) (Shoresh et al., 2010). *In fine*, the completion of these physiological events leads to multiple host resistances. While a considerable body of literature demonstrates the use of antagonistic *Trichoderma* spp. as an efficient alternative to conventional approaches in controlling various soil-borne phytopathogens (Verma et al., 2007), and that includes several *F. solani* strains capable of infesting different hosts like annual plant species (Rojo et al., 2007; Tae Gwan and Knudsen, 2013), only a few preliminary reports have evaluated the effectiveness of *Trichoderma* spp. against several olive tree pathogens (including some *Fusarium* strains) on olive trees (Moussa et al., 2006). The tripartite interaction *T. harzianum*/olive tree/*F. solani* needs to be further understood.

This study was undertaken to investigate the antagonistic effect of the fungus *Trichoderma harzianum* strain *Ths97* on the phytopathogen *Fusarium solani* strain *Fso14* in olive trees. First, we examined *Ths97*'s capability to reduce fusarium dieback symptoms caused by *Fso14*, both in the root system (primary site of infection) and in the aerial plant parts that develop secondary symptoms with leaf collapses. Second, we evaluated the impact of *Ths97* and *Fso14* (alone, and in combination, either preventively in primed plants or curatively in diseased plants) on expressing defense-related genes from major defense pathways. Third, we investigated the potential mycoparasitic activity of *Ths97* on *Fso14* in *in vitro* condition at a microscopic level. Then we discussed how a

better understanding of the multiple mechanisms involved when *F. solani* *Fso14* is inhibited by *T. harzianum* strain *Ths97* could provide valuable guidance for using *T. harzianum* strain *Ths97* to control fusarium root rot biologically.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and fungal strains

Olea europaea cultivar *Chemlali* obtained from herbaceous cuttings of two-year-old plants were used for assays. This cultivar is highly susceptible to several soil-borne fungi such as *Fusarium* spp., including *F. solani* strain *Fso14* (Triki et al., 2009). Plants were planted in plastic bags containing autoclave-sterilized sandy clay soil, and kept in a growth chamber. Bioassays were carried out using gnotobiotic experimental conditions aimed at reducing any artifact tied to possible microorganisms that can interfere with the *Trichoderma* and *Fusarium* protagonists or the relationship between them. Plant growth parameters were 16-h photoperiod, 26/23 °C (day/night), relative humidity of around 70%, and regular irrigation. *F. solani* strain *Fso14* was previously isolated from rotted roots of young olive trees showing dieback symptoms in Tunisian orchards. *Fso14* was identified by using molecular methods based on the sequencing amplification products of the *ITS* regions by PCR with an accession number KU863548. *Trichoderma harzianum* strain *Ths97* (Triki and Priou, 1997) from Tunisian farmland was the bioagent used as an antagonist against *Fso14*. All fungi strains are recorded at the "Institut de l'Olivier" (University of Sfax, Tunisia). For experiments, fungi were grown on PDA plates (Potato Dextrose Agar: 200 g potato, 15 g dextrose, 20 g Agar-agar, *qsp* 1L distilled water), and incubated in darkness for 7–10 days, and at 25 °C and 27 °C for *Fso14* and *Ths97*, respectively, to allow abundant conidia production.

2.2. In planta antagonism assay

Antagonism tests on plants were conducted by inoculating olive tree roots with conidia suspensions prepared by mixing the contents of four agar plates (6 cm diameter) with 600 ml of sterile deionized water in a blender for 2 min at high speed. Roots were carefully dug out, cleaned with tap water, and submerged for 1 h in the inoculum suspensions (Triki et al., 2011). Control plants were handled similarly with sterile water. After inoculation, plants were replanted in plastic bags containing new autoclave-sterilized sandy clay soil. For the confrontation assays, *Ths97* and *Fso14* were inoculated successively with 6 days between each inoculation. The preventive assay corresponds to plants inoculated with *Ths97* in the first step, and the curative assay corresponds to plants inoculated with *Ths97* in the second step. The pathogenicity of *Fso14* was assessed weekly for 8 weeks by measuring the severity of aerial symptoms using the 0–4 scale developed by Sanchez-Hernandez et al. (1998). This scale examines the percentage of yellowing or necrotic foliage, where 0 = 0%, 1 = 1–33%, 2 = 34–66%, 3 = 67–100%, and 4 = dead plant. The number of biological repetitions was: *n* = 6 for water control plants, *n* = 9 each for *Ths97* and *Fso14* infested plants, and *n* = 18 each for curative and preventive treatments. Eight weeks after the experiment started, and for each biological condition, all plant roots were carefully harvested and randomly pooled to give three biological replicates, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until needed for molecular analyses.

2.3. In vitro antagonism assay

In vitro confrontation tests were done as previously described (Behamou and Chet, 1997). Two mycelial plugs (8 mm diameter) were cut from the edge of actively growing cultures of *Ths97* and *Fso14* respectively, and placed 4-cm apart in a new PDA plate. The paired

cultures and control cultures (*Fso14* alone) were incubated at 27 °C in the dark and sealed with Parafilm. The radial growth of each mycelial colony was monitored daily. The percentage of mycelial growth inhibition *I* (%) by *Ths97* was calculated according to Whipps (1997) by applying the following formula:

$$I(\%) = (1 - Dn/Do) \times 100 \quad (1)$$

where *I* (%) represents the mean inhibition of mycelial growth, *Dn* is the mean diameter of *Fso14* growth in the presence of *Ths97*, and *Do* is the mean diameter of *Fso14* growth in the absence of *Ths97* (control). Experiments were done in triplicate. Parasitic activity was observed under a microscope at 100X, by adsorbing mycelia on clear tape at the interaction area between *Ths97* and *Fso14* after 24–48 h of mycelial confrontation, and then apposed on microscope slides. The occurrence of several specific hyphae contact structures (*i.e.* coiling, adjacent hyphae, papilla-like structure, and consecutive disruptions in cell morphology of *Fso14*) was considered evidence of mycoparasitism (Harman et al., 2004; Chacon et al., 2007).

2.4. RNA isolation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA from plant roots was extracted according to Chang et al. (1993). Root tissues were ground to a fine powder in liquid nitrogen and transferred into 1 ml of lysis CTAB extraction buffer (bromide cetyltrimethylammonium). The homogenate was incubated for 5 min at 65 °C, and treated twice with 1 vol of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). The supernatant was collected and treated overnight in 2 M of LiCl at –20 °C. The precipitate was collected by centrifugation (16,000g for 45 min) and was washed with 80% ethanol. Pellet was dissolved in 25 µl of water (DEPC) before being treated with 10 U RNase free-DNAse (Promega, Madison, WI, U.S.A.) for 30 min. After two chloroform:isoamyl alcohol (24:1) washes, total RNA was precipitated with 100% ethanol (2V) 2 h at –20 °C. After centrifugation at 16,000g for 30 min, the pellet was washed with 80% ethanol, dissolved in 50 µl of water (DEPC), and stored at –80 °C for further analysis. RNA concentrations were determined by spectrophotometry at OD 260/280 (spectrophotometer ND-1000, Nanodrop, France), and quality was checked by using 2% TAE/agarose electrophoresis.

First-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA by using oligo-nucleotide-deoxythymidine primers in a final volume of 20 µl following the protocol provided in SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™). The synthesized cDNA was diluted 10-fold with sterile water, and used as a template for PCR. The abundance of defense-related transcripts was determined by Real-time Q-PCR with a MyiQ instrument (Bio-Rad), using the comparative C_t method. To normalize the amount of transcripts present in each reaction, seven putative internal controls (housekeeping genes) were tested. Gene encoding for *beta-Actin* (AC:AF545569, Schilirò et al., 2012; Ray and Johnson, 2014) was chosen as a housekeeping gene for its stable constitutive expression during fungus infestation. Primers used in this study were selected from those used in previous works on olive defense responses (Corrado et al., 2012; Gómez-Lama Cabanás et al., 2014, 2015). Four primer pairs were designed specifically for this study with the Primer3plus application (<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>), including stilbene synthase (SS), peroxidase (POD), Pathogenesis-Related protein 1-like (PR1), and isochlorismate synthase (ICS). Corresponding gene sequences were retrieved by BLAST searches within the Olive Genome and Annotation database <http://denovo.cnag.cat/genomes/olive/>. All primer and gene nomenclature is detailed in Table S1. PCR was done in a 96-well plate with a total volume of 15 µl, containing 10 µl of MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec), 0.5 µM (each) of forward and reverse primers, and 2 µl of cDNA template. Amplifications were done using the following cycle parameters: 94 °C for 30 s, followed by 35 cycles at 94 °C for 15 s, 54/60 °C (according to primer pairs) for 15 s, 72 °C for 20 s, followed by generating a dissociation curve to confirm the amplification of PCR

single bands. Gene expression levels were quantified from the threshold cycle (C_T) according to the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). In order to evaluate the differential fold change of an isoform from the fungus-challenged olive assays, cDNA synthesized from the untreated-olive assay was used for normalization. Before calculating relative expression levels, PCR efficiency and specificity were tested for each pair of primers on cDNA from a mix of control olive samples according to the protocol used by Livak and Schmittgen (2001). PCR was performed as described above in triplicate. The PCR efficiency and correlation coefficients (R^2) of each primer pair were generated using the slopes of the standard curves. The efficiencies were calculated by the formula: efficiency (%) = $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) * 100$. This was particularly important for primers originally designed for tracking gene expression in leaf organs (Corrado et al., 2012; Gómez-Lama Cabanás et al., 2014, 2015). All PCR technical samples were assayed in triplicate, and reactions were done for three biological replicates.

2.5. Statistical analysis

The effect of *Ths97* on *Fso14* (*in planta* and *in vitro* tests) and the expression of defense-related genes for each biological assay were presented as the mean ± Standard Error. Quantitative data for the *in vitro* test and the expression of defense-related genes were analyzed using the parametric method from STATISTIX V8 software (2012); to be precise, a one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by a Tukey's honestly significant difference (HSD) post hoc test ($P < 0.05$). Concerning the statistical analyses for evaluating the antagonism test *in planta*, they were performed using SAS, version 9.3 (SAS Institute, Cary NC). Because disease severity was assessed using an ordinal rating scale ($j = 0, \dots, 4$), the dataset was analyzed using rank-based nonparametric methods thoroughly detailed in Supplemental Fig. S1.

3. Results and discussion

3.1. *In planta* protective effect of *T. Harzianum Ths97* against the spread of *Fusarium* root rot disease

F. solani isolates were isolated from young olive trees showing dieback symptoms, and collected from different nurseries and new orchards. *F. solani* frequency varied between locations, and even though this strain shows different degrees of aggressiveness on various olive tree clones, it systematically causes both high disease incidence and severity (Dr. Triki, unpublished results). In this study, the pathogenicity test demonstrated that the strain *Fso14* was pathogenic to *Olea europaea* var. *Chemlali*, and induced typical symptoms on all parts of the olive plants and for all treated plants (Fig. 1A). Aerial symptoms consisted of yellowing and chlorosis of leaves and twig dieback that ultimately browned and defoliated. Concerning the root system, symptoms were quite unspecific with expected severe rot. All *Fso14*-challenged plants rapidly declined and began to die after seven weeks of infestation (Figs. 1B2 & 2). In dual inoculation contexts, *Ths97* incorporated into the root mixture significantly reduced aerial disease severity. This protection is correlated with an apparent healthy state of the root system, in particular in comparison with *Fso14* infected plants (Figs. 1B-4 & 5). Protection effectiveness was significant after the fifth week of co-inoculation, reducing the severity of foliar symptoms by 50% and 25% in preventive and curative contexts, respectively (Fig. 2AB, Supplemental Fig. S1.). Disease severity seemed to decrease rapidly, which corresponded to the emergence of new young leaves. It should be pointed out that *Ths97* biocontrol of *Fso14* not only prevented emergent disease but remarkably, made it possible for *Fso14* diseased plants to recover health when *Ths97* was used remedially, demonstrating the efficiency of *Ths97* as a beneficial fungal biocontrol agent. These outcomes are promising because they emphasize the opportunity of using this strain as an ultimate recourse for a curative therapeutic option on diseased crops.

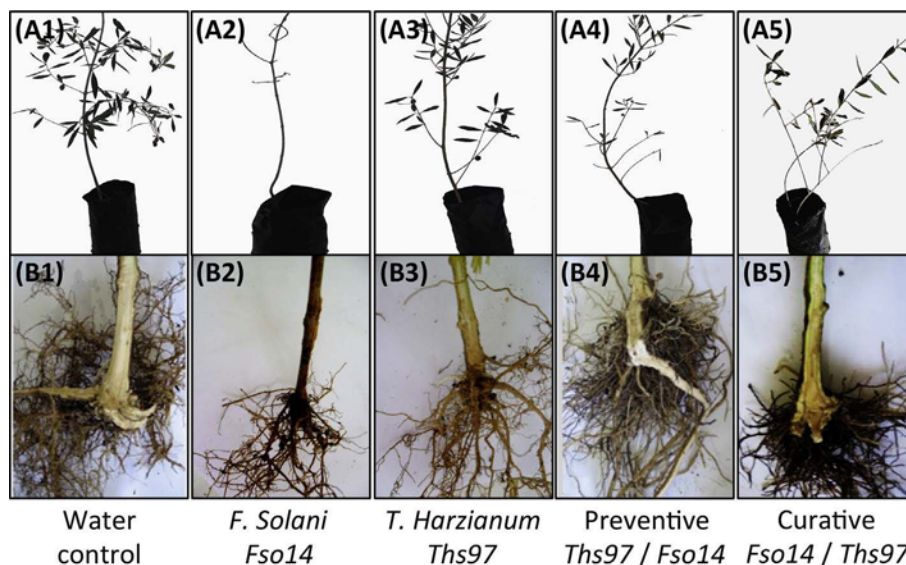


Fig. 1. Symptoms of Fusarium root rot disease on aerial (A) and root (B) systems from two-year-old olive tree transplants after eight weeks of fungal invasion. (A1-B1) water control; (A2-B2) *F. solani* *Fso14* inoculated plants; (A3-B3) *T. harzianum* *Ths97* inoculated plants; (A4-B4) Preventive treatment: *Ths97* treated plants followed by *Fso14* infestation; (A5-B5) Curative treatment: *Fso14* infested plants treated with *Ths97*. Both dual inoculation contexts were done with a 10-day delay separating each fungal inoculation. All fungi were inoculated on roots.

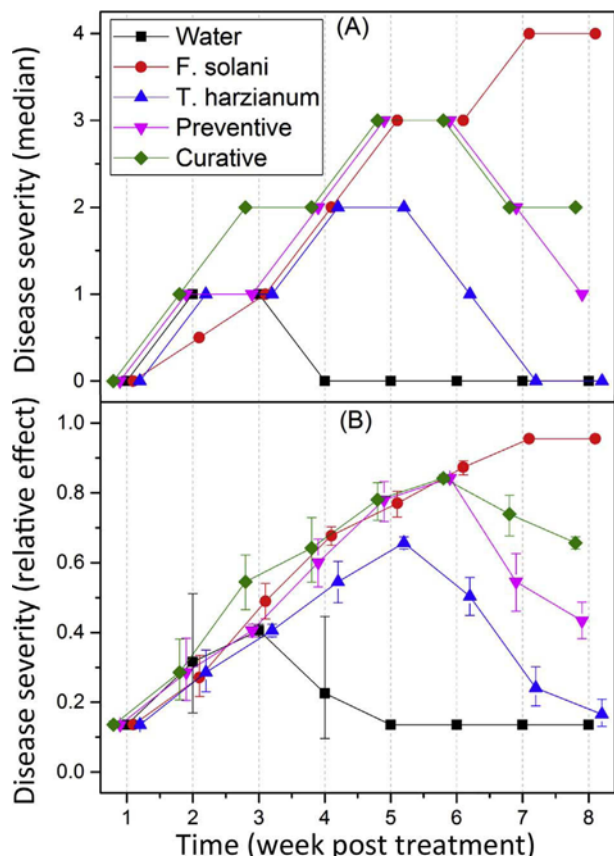


Fig. 2. Disease severity indices related to *in situ* antagonism test. Median disease severity rating (A) and estimated relative marginal effects (B) for fusarium root rot disease on olive transplant aerial part according to treatment (water control, *F. solani* *Fso14*, *T. harzianum* *Ths97*, Preventive, and Curative treatments), assessed over 8-week period. Both dual inoculation contexts were performed with 10-days delay separating fungal inoculation. Vertical bars in B: 95% confidence limits. Statistical procedure is detailed in Supplemental Fig. S1.

Nevertheless, it should be pointed out that even though the *Ths97*-treated plants lost half of their leaves (Fig. 2.), the situation turned out to be reversible. *Ths97*-treated plants rapidly stimulated the emergence

of new leaves by the end of the 5th week and restored their entire foliage by the end of the experiment. This unexpected physiological event was also observed with the water treatment, but to a lesser extent. Physiologically, it is plausible that the decline in plant health in the first three weeks was caused by injuries to the finest roots during handling and re-potting of the plants. These collateral effects seem to be more marked with fungal treatments, possibly due to the special relationship that plants can establish with fungal partners. But most of all, that fact reveals that the earliest stages of a fungal treatment may be critical for young plants, and particularly it highlights that a BCA application should not be viewed as inconsequential.

3.2. *In vitro* antagonistic effect of *T. Harzianum* *Ths97* on *F. Solani* *Fso14* mycelia growth

Based on the biological facts above, *in vitro* work was undertaken to gain a better understanding of the competitiveness and biocontrol ability of *Ths97* against *Fso14*. In dual culture tests on Petri plates, *Ths97* rapidly stopped *Fso14* mycelia growth, and completely covered the *Fso14* colony (Fig. 3). *Ths97* colonized a large area of the culture medium due to its faster mycelial growth than *Fso14* (Fig. 3A, Supplementary Fig. S1.). This ability to grow rapidly gives the antagonist a notable advantage in competition for space, nutrients and dominance over its prey host, all being equally important and mutually inclusive phenomena (Altomare et al., 1999; Benitez et al., 2004). Just before physical contact between hyphae after 3 days of growth, a thin pre-contact zone of growth inhibition for *Ths97* can be observed for several hours. This initial interaction between *Fso14* and *Ths97* may involve both defensive and offensive combat from both protagonists. It suggests that *Fso14* initially interferes with the growth progress of *Ths97*, probably due to the release of diffusible, non-volatile organic inhibitory compounds. These secondary metabolites and/or antibiotics may interfere at a short distance with cell metabolic activity tied to development and expansion, but it can be reasonably speculated that *Ths97* has the ability rapidly to detoxify them. Indeed, after this short 3-day incubation period of cross signaling by pre-contact chemical dialog between fungi, *Fso14* hyphal growth definitively ceased and reached a ceiling at 65% compared to the control (Fig. 3- Supplementary Fig. S1.), while *Ths97* was able to encroach into the inhibition zone and overlap the *Fso14* colony. Furthermore, *Ths97* rapidly activated a heavy sporulation at various spots of its hyphal

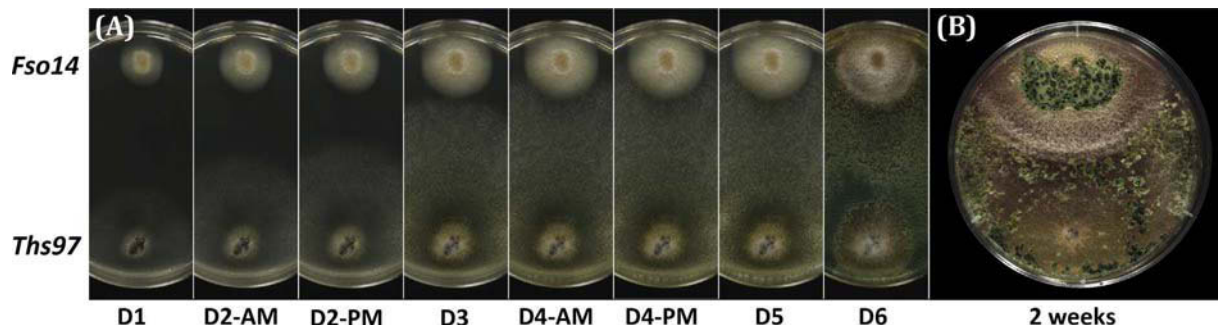


Fig. 3. Development of the mycoparasitic reaction of *T. harzianum* Ths97 against *F. solani* Fso14. (A) Growth kinetic of *T. harzianum* Ths97 and *F. solani* Fso14 on PDA medium for 6 days. (B) Plate confrontation assays where *T. harzianum* Ths97 mycelial overgrew and sporulated on *F. solani* Fso14 two weeks after inoculation (27 °C).

expansion, including on the *Fso14* colony (Supplementary Fig. S1.). This last physiological feature depicts an important step in *Trichoderma*'s parasitic activity (Brunner et al., 2005).

Optical microscopic analysis of contact and overgrowth zones showed that most of the *Ths97* hyphae grew alongside that of the host with numerous contact points, and branching toward adjacent *Fso14* hyphae (Fig. 4.). This branching of *Ths97* hyphae may be an active response, probably due to chemo-attractants released by the host prey, which drive the course of *Ths97* hyphae. Some evidence of development of helicoidal-shaped hyphae by the mycoparasite around the host hyphae (or “coiling”) were observed. These coiled cell structures are commonly seen from various mycopathosystems, but they are not systematic (Moraga-Suazo et al., 2011). As observed macroscopically, the intense sporulation of *Ths97* formed several spore aggregates that adhered to the host hyphae. However, restricted by technical limits, no germination was clearly discernable after adhesion in our *in vitro* experiment. The physical contact between mycelia included the rounding and blistering of some *Ths97* hyphal apex, corresponding to the formation of papilla-like structures. Lastly, numerous *Fso14* hyphae in contact with *Ths97* hyphae exhibited disintegrated-like morphological disruptions. Many morphological deformities have been reported in the past for the target fungus, manifested by plasma membrane retraction, cytoplasm aggregation and vacuolization, formation of numerous septae in the host giving a bead-chain appearance, initiation of cell wall degradation and necrosis. These manifestations were typically assigned to the inhibitory performance of BCAs such as *Trichoderma*

spp. on its hosts (Benhamou and Chet, 1997; Benitez et al., 2004). Interestingly, these microscopic events paralleled with physiological changes in the macroscopic aspect of *Fso14* mycelia, such as a relative waxy moist appearance with a wide brownish pigmentation of the colony (Fig. 3.). Similar excessive pigmentation developed by *Fso14* was earlier shown for other *Fusarium*, and this particularity is connected to a physiological response to environmental changes in the vicinity of the stressed fungus tied to nutritional deficiencies, self-defense and antagonism against the competitor fungus (Son et al., 2008).

Collectively, macroscopic and microscopic phenomena deployed by *Ths97* leading to collapse of *Fso14* hyphae during invasion are highly informative: both clearly substantiate mycoparasitic activities for *Ths97*. These outcomes do not necessarily translate into what actually happens upon physical contact between mycelia *in planta*. In this light, these abilities would need to be clarified in future research.

3.3. *Harzianum* Ths97, an enhancer of root defense pathways in olive trees

A beneficial *Trichoderma* sp. could contribute to alleviating plant disease symptoms in *de novo*- or modulation of an array of gene expressions involved in the host plant immune system. Transcriptional regulation of various defense-related genes in olive trees was analyzed during the colonization of the root system by the beneficial agent *Ths97* alone or in the presence of its prey *Fso14* (Fig. 5.). Root tissues were sampled eight weeks after fungi inoculations. This amount of time is long enough for *Ths97* to effectively

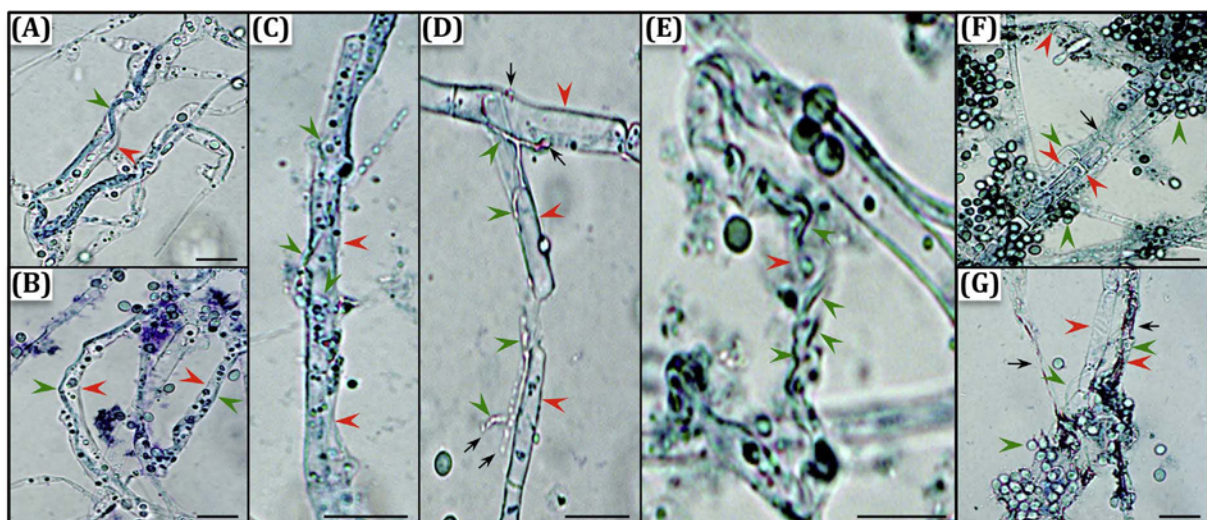


Fig. 4. Mycoparasitic reaction of *T. harzianum* Ths97 against *F. solani* Fso14. Signs of mycoparasitism of *T. harzianum* Ths97 (green arrow) on *F. solani* Fso14 (red arrow), using optical microscopy (×100), and after coloration with methylen blue (1% w/v). Hyphae were sampled at the confrontation zone and from the *Ths97*-overgrown *Fso14* colony by adsorbing mycelia on clear tape. (ABCD) Antagonistic *Ths97* hyphae growing alongside *Fso14* hyphae, where (DE) coiling points were observed; (D) branching events with *Ths97* papilla-like structures on *Fso14* hyphae (black arrows); (FG) *Ths97* spore aggregates around *Fso14* hyphae; (AFG) morphologic deformities of *Fso14* (black arrows). Scale bars represent 10 μm in all panels. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

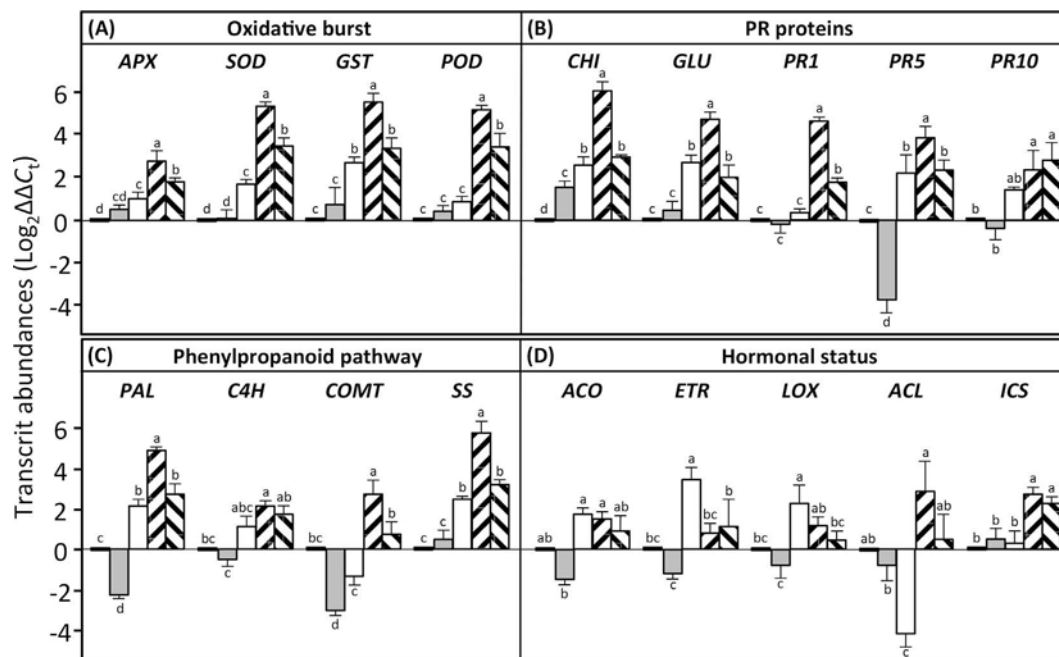


Fig. 5. Defense-related gene modulation in olive tree roots following fungal inoculations, alone or in preventive or curative combinations. (X) Water control, (X) *F. solani* Fso14, (X) *T. harzianum* Ths97, (X) Preventive treatment, (X) Curative treatment. (A) Oxidative burst; (B) Pathogenesis-related protein; (C) Phenylpropanoid pathway; (D) Hormonal status. Data correspond to the mean of three independent biological experiments. Bars represent the biological standard error. Letters on vertical bars indicate significant differences between treatments (Tukey post hoc test after one-way Analysis of Variance (ANOVA), $P < 0.05$).

penetrate the area inside and around olive tree roots as previously observed with other *Trichoderma* strains (Ruano-Rosa et al., 2016; Carrero-Carron et al., 2016). Genes related to oxidative stress (Fig. 5A), PR proteins (Fig. 5B), phenylpropanoids synthesis (Fig. 5C) and hormonal status (Fig. 5D) were analyzed by quantitative real-time RT-qPCR. These defense-related markers participate in the first lines of preformed and inducible defense reactions (namely innate immunity of basal resistance) that protect plants from pathogen threats (Jones and Dangl, 2006). Most of them had been previously characterized in olive trees in interaction with the beneficial endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 (Schilirò et al., 2012; Gómez-Lama Cabanás et al., 2014) or the pathogen *Verticillium dahliae* (Gómez-Lama Cabanás et al., 2015). Because plant defense and surveillance systems are above all unspecific global cell processes against entire groups of pathogens, we expected here that these defense-related genes could play a role in the tripartite myco-phytopathosystem.

For the majority of the defense responses monitored, *Ths97* and *Fso14* induced a contrasting accumulation of transcripts. *Ths97* mostly induced up-regulations, although small, while *Fso14* induced several strong inhibitions. These differential expression patterns could be explained by the specific ability of each agent, whether beneficial or pathogen, to activate or repress, respectively, elements involved in some crucial, although non-specific, stages of plant defense response. Whereas *Fso14* would behave like several other phytopathogen agents that actively establish intimate connections with their host plants in order to suppress various defenses during compatible interaction (Alba Juan et al., 2011), the plant seems to recognize *Ths97* to trigger the accumulation of its defenses as responses. However, although a *Ths97* inoculation initially caused some leaf damage, it does not seem to be identified as a threatening agent by the plant that rapidly recovered. It therefore seems probable that *Ths97*, although recognized by the plant, was able to overcome several host defenses as discussed below. How *Trichoderma* operates such a substantial advantage, i.e. tolerance and/or metabolism of plant defense molecules, is little understood. More interestingly, plant responses were further enhanced when *Ths97* and *Fso14* were co-inoculated (Fig. 5). This three-player interaction (plant-BCA-pathogen) induced a stronger accumulation of most transcripts

encoded for defense-related proteins as compared to *Ths97* alone. These transcriptional steady state levels are very intriguing, and resemble the unique physiological situation called the “priming effect” (Martinez-Medina et al., 2016). This particular defense response can be observed in pre-stimulated plants that display a faster and/or stronger modulation of defense-related genes when they are subsequently challenged by a pathogen. And this is especially apparent for olive tree roots preventively colonized with *Ths97* prior to *Fso14* infestations, and might explain the faster reduction in disease severity compared to the curative context (Fig. 2). Some works have substantiated such a priming effect induced by several *Trichoderma* strains against different pathogens (Yedia et al., 2003; van Hulst et al., 2006; Gallou et al., 2009; Perazzoli et al., 2011; Brotman et al., 2013), but hitherto data is mostly fragmentary and the related underlying molecular mechanisms are still largely misunderstood (Conrath, 2011; Martinez-Medina et al., 2016). However, the benefits of priming outweigh the costs when disease does occur, and several authors rightly point out the need to use primed plants as a promising strategy in disease management (van Hulst et al., 2006; Beckers and Conrath, 2007; Perazzoli et al., 2011).

The impacts on cell structure and/or physiology following an over-accumulation of typical and unspecific defenses are well described. Therefore, our hypotheses related to possible physiological behavior of the two fungi in olive trees have led us to define possible avenues for further thorough reflection. Indeed, despite the non-exhaustiveness of the defenses studied here, the expression pattern of these eighteen markers was very informative. In a phytopathological context, it reveals the occurrence of an oxidative burst which is one of the earliest defensive manifestations of stressed plants to attack by invaders (Lehmann et al., 2015). In our work, SOD, APX, and GST are significantly up-regulated with *Ths97*, and not significantly modulated by *Fso14* ($P \leq 0.05$) (Fig. 5A.). In a preventive context, and to a lesser extent for the curative context, all are highly up-regulated. These modulations are in accordance with previous studies showing that up-regulation of these genes plays a positive key function in the defense system of plants challenged by beneficial agents possibly engaged in ROS detoxification (Singh et al., 2011). Thus, whatever the oxidative status of the challenged roots, no necrotic lesions have been macro-

scopically observed. It first of all reflects that, after fungus colonization, the roots have triggered an oxidative burst, but most importantly they have responded adequately to prevent any cell damage by readjusting the balance that occurred between the enzyme systems involved in ROS-generation and ROS-scavenging. It is interesting to note that an up-regulation of the antioxidant machinery in roots seems to be a general mechanism used by different *Trichoderma* strains during plant invasion (Singh et al., 2011; Mastouri et al., 2012; Brotman et al., 2013; Gajera et al., 2015). Up to now, very little clues are available about how biocontrol agents act to protect host cells by suppressing ROS over-accumulation in plants under biotic stress (Alquéres et al., 2013). Paradoxically, every life form is sensitive to the suddenness of oxidative burst. This includes biotrophic fungal phytopathogens which ROS are first directed to counteract within the plant. Thus, the question may arise as to how the beneficial agent can also tolerate such an oxidative environment. It is probably due to *Trichoderma*'s ability to modulate accordingly its own ROS-scavenging pathways to ensure rapid turnover of the ROS and maintain an acceptable ROS homeostasis. Concerning BCAs, it has been proven that ROS may be a driving force in stimulating the arsenal of hydrolase-encoding genes involved in biocontrol activity against phytopathogens (Montero-Barrientos et al., 2011; Lorito et al., 2010). However, to the best of our knowledge, even though potential ROS-producers have been defined for some *Trichoderma* strains (Montero-Barrientos et al., 2011; Hernández-Oñate et al., 2012), there is no available information on the cell regulation networks deployed by *Trichoderma* to prevent and detoxify itself against the plant's ROS.

As for other defense reactions, results indicate that gene encoding for PR-proteins (β -1,3-glucanase, chitinase, thaumatococin-PR5, and Ribonuclease-PR10), with the exception of PR1 (Fig. 5B.), and for proteins involved in phenylpropanoids biosynthesis (PAL, C4H, COMT, SS) (Fig. 5C.), were up-regulated in olive tree roots by the beneficial agent *Ths97* when most of them were repressed or non-modulated by the pathogenic agent *Fso14* (aside for CHI). As previously observed with the oxidative pathway, most of these genes were expressed when *Ths97* and *Fso14* were co-inoculated, and even more strongly in a preventive context with primed plants. PR proteins are host-coded proteins stimulated by biotic stress, and their accumulation in response to invading pathogens is one of the crucial steps in the inducible portion of a plant's self-defense mechanism (Sels et al., 2008). The two hydrolytic enzymes GLU and CHI show direct antifungal activity by decomposing the β -1,3-glucan and chitin residues which constitute the fungal cell wall (Edreva, 2005). GLU has also been reported to have an indirect effect following degradation of the fungal cell wall by releasing oligosaccharide elicitors, which can activate plant defense mechanisms as secondary amplifier signals (Tian et al., 2011). The phenylpropanoid pathway serves as a rich source of metabolites in plants (or phenylpropanoids) derived from the carbon skeleton of Phenylalanine. High concentrations of these molecules around pathogen-infected areas are known to restrict or weaken pathogen growth. PAL is the key enzyme in the first stage of phenylpropanoid metabolism, and with ROS and POD, they participate in the biosynthesis of *p*-coumaric acid derivatives, phytoalexins, cell-wall thickening and lignification, papilla formation, and other secondary metabolites that contribute to the localized and systemic plant resistance processes (Yedidia et al., 2003).

In dual inoculation of *Ths97* with *Fso14*, high accumulation of transcript encoding for some PR-proteins and phenylpropanoid proteins correlated with the olive tree induced resistance against *Fso14*. A large amount of scientific literature has been dedicated to this topic, and some authors have argued that plant defense induced by the antagonist might be one of the pivotal biocontrol mechanisms by which phytopathogens can be indirectly inhibited (Schilirò et al., 2012; Lu et al., 2013). As for ROS issues, it is tempting to hypothesize that *Ths97* deals with the plant defense system by deploying detoxifying self-defense mechanisms. They may engage a large panel of hydrolytic enzymes or proteases, ABC efflux transporters, and pleiotropic and multidrug resistance transporters, those that are involved in the defense responses

of some *Trichoderma* against the prey's weapons (Kapat et al., 1998; Benitez et al., 2004; Seidl et al., 2009; Ruocco et al., 2009; Monteiro et al., 2010; Chen et al., 2011). A whole transcriptome shotgun sequencing of *Ths97* would make it possible to identify the full involvement of these cell detoxifying processes in protecting cells, colonizing olive tree roots, and expressing mycoparasitic activity.

Lastly, *Trichoderma* activates the signaling pathways responsible for expressing genes by reprogramming the responsive plant hormonal status (Zamioudis and Pieterse, 2012). Plant hormones play a key role in modulating plant defense responses, operating in two major defense pathways, relying on jasmonic acid (JA) and ethylene (Et), or salicylic acid (SA). They modulate each other via complex networks of regulatory cross-talk based on different types of host-pathogen interactions (Jones and Dangl, 2006). In this study, the modulation was recorded of five marker genes known to be involved in activating JA/Et- and SA-mediated signaling pathways (Fig. 5D.) (Choudhary et al., 2007; Schilirò et al., 2012). Although accumulation profiling of related mRNA does not exactly translate to plant hormonal status, it does offer a good overview about hormonal events that occurred during the dual fungus colonization. Our results showed that the genes encoding for the ACO enzyme and the ETR transcription factor related protein (ethylene pathway) and the lipoxygenase (JA pathway) are significantly up-regulated by *Ths97* and slightly repressed or not modulated by *Fso14*. In contrast, one of the key enzymes for SA biosynthesis ICS (isochorismate synthase), the SA binding enzyme ACL also engaged in the cyanogenic glycosides catabolism, and the pathogenesis-related protein PR1 (classically presented as influenced by SA) were highly repressed or not significantly modulated by *Ths97* and *Fso14*. These gene modulations agreed with previous work showing particular reprogramming [JA/Et – SA] balances which occur in some *Trichoderma* spp. (Salas-Marina et al., 2011), or biotrophic pathogen plant interactions (Glazebrook, 2005). For some plant species, the JA/Et-signaling pathway is believed to be in favor of *in planta* colonization by biotrophs, which could correspond to the trophic feature of *Ths97* and *Fso14*. Remarkably, this SA-signaling pathway was highly accelerated when fungi were co-inoculated. Such a putative switchover in SA status could partially explain an adequate resistance in primed root olive trees responsible for preventing *Fso14* development (Fig. 2.). A final aspect of this relationship is the BCA's induced systemic resistance (ISR) response of the host plant. Although it was not a focus of this study, a change of local hormonal homeostasis may also interfere with systemic modulation of the plant defense system. However, *Trichoderma*'s ISR process appears to be complex and host plant dependent. Most hormone signaling pathways are interlocked together, and the outcome of the hormonal network as a whole determines the effectiveness of the immune response to a specific type of invader (Zamioudis and Pieterse, 2012). Now, because ISR confers broad-spectrum resistance to various types of abiotic stresses or soil-borne phytopathogens and any opportunistic aerial invaders, it is an attractive tool for modern sustainable agriculture. *Ths97* as an ISR-inducer in olive trees will be monitored in the near future.

Taken as a whole, these molecular data indicated that *T. harzianum Ths97* could locally modulate various signaling pathways involved in the innate immunity system in roots. Furthermore, *Ths97* seemed to exacerbate this innate immunity when co-inoculated with its prey, *Fso14*, creating favorable resistance-primed physiological conditions. Because an over-modulation of defense-related genes coincided with a cessation of the spread of fusarium root rot, further studies are necessary on the interactions between olive tree roots, the phytopathogen *F. solani* and the beneficial bioagent *T. harzianum Ths97* in order to fully understand the underlying physiological processes.

4. Socio-environmental challenge – Conclusion

In conclusion, the clear suggestion from our work is that mycoparasitism by *T. harzianum Ths97* can be used as a powerful biological

weapon to stop fusarium root rot disease in olive trees caused by *F. solani* Fso14. Because biocontrol development is largely the result of a litmus change in consumer attitude towards the use of hazardous chemical pesticides and fungicides, this feature responds perfectly to concerns of a more well-thought out, responsible modern agronomical approach which inspires a growing awareness of ecology and health. However, it is widely agreed that a large array of soil parameters (abiotic factors and endogenous microbial activity), in synergy with agronomical factors such as how the biocontrol agents are applied to the ecosystem (number and timing of applications), have profound effects on the biological control efficiency of *Trichoderma*. Thus, because *Trichoderma* spp. is among the most-promising biocontrol fungi used in controlling many fungal plant pathogens, it is important that the biocontrol ability of this strain *Ths97* specifically should be further thoroughly evaluated under field conditions.

Conflict of interest

There exists no potential conflict of interest among the authors.

Author contributions statement

Maroua BEN AMIRA co-designed and participated to all of the experiments, and wrote the first draft of the article;

David LOPEZ and Sébastien RIBEIRO participated to the *in vitro* fungal confrontations, and to the gene expression experiments and related bioinformatics analysis;

Mohamed Ali TRIKI provided the two strains of fungi used in this study and carried out all of the experiments on olive trees with Maroua BEN AMIRA;

Ali KHOUAJA, Hatem CHAAR, Aurélie GOUSSET-DUPONT, Boris FUMANAL, Philippe LABEL, Valérie PUJADE-RENAUD, Ludovic BONHOMME, Daniel AUGUIN, Pascale GOUPIL and Jean-Louis JULIEN have ensured a critical examination of the manuscript;

Jean-Stéphane VENISSE led the program, co-designed the experiments, obtained the funding, and coordinated and compiled authors' contributions to the final version of the article. He wrote the final draft of the article and edited it.

All the authors participated in the analysis of data, and collectively approved whole of the result interpretation and related hypothesis.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the “Institut de l’Olivier” (Department of “Amélioration et Protection des Ressources Génétiques de l’Olivier” located at the University of Sfax, Tunisia) for providing the two strains of fungi used in this study, and for carrying out all of the experiments on olive trees. We are very grateful to Céline Sac, Nicole Brunel-Michac and Dominique Marcon for their technical assistance in molecular biology, microscopy and photographic editing, respectively. The authors also wish to acknowledge Gisèle Bronner (UMR CNRS 6023) for helpful discussion, and Christie Nielsen for generously providing the final linguistic revision of the manuscript. This work was supported by the PHC program “Uthic” from Campus France (Grant 34861PF) established between the Tunisian Ministry of Foreign Affairs and the French Ministry of Higher Education and Scientific Research. We are also grateful to the anonymous reviewers for their constructive comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.008>.

References

- Alba Juan, M., Glas Joris, J., Schimmel Bernardus, C.J., Kant Merijn, R., 2011. Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens. *J. Plant Interact.* 4, 221–227.
- Alquéres, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., Schmid, M., Hartmann, A., 2013. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 937–945.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Bjbrkman, T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295–22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2926–2933.
- Barreto, D., Babbito, S., Perez, B.A., Docampo, D., Otero, L., Costilla, M., Roca, M., 2001. Current status of the syndrome (seca) of olive trees in Argentina. *Phytopathology* 91, S71.
- Beckers, G.J.M., Conrath, U., 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 425–431.
- Benhamou, N., Chet, I., 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2095–2099.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249–260.
- Bouhila, M., 2011. Current knowledge on major disorders of Olive in Tunisia. *Revue Ezzaitouna* 12, 1–7.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A.R., Chet, I., Viterbo, A., 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens* 9, e1003221.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C.P., Mach, R.L., 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3959–3965.
- Carrero-Carron, I., Trapero-Casas, J.L., Olivares-García, C., Monte, E., Hermosa, R., Jimenez-Díaz, R.M., 2016. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Protectoin* 88, 45–52.
- Chacon, M.R., Rodriguez-Galan, O., Benitez, T., Sousa, S., Rey, M., 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int. Microbiol.* 10, 19–27.
- Chandel, S., Deepika, R., 2010. Recent advances in management and control of *Fusarium* yellows in *Gladiolus* species. *J. Fruit Ornamental Plant Res.* 18, 361–380.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J., 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113–116.
- Chen, L.L., Yang, X., Raza, W., Li, J., Liu, Y., Qiu, M., Zhang, F., Shen, Q., 2011. *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelo-chemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1653–1663.
- Choudhary, D.K., Prakash, A., Johri, B.N., 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanisms of action. *Ind. J. Microbiol.* 47, 289–297.
- Coleman, J.J., 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol. Plant Pathol.* 17, 146–158.
- Conrath, U., 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* 16, 524–531.
- Cook, R.J., 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 53–80.
- Corrado, G., Alagna, F., Rocco, M., Renzone, G., Varricchio, P., Coppola, V., Coppola, M., Garonna, A., Baldoni, L., Scaloni, A., Rao, R., 2012. Molecular interaction between the olive and the fruit fly *Bactrocera oleae*. *BMC Plant Biol.* 12, 86.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.
- Djonovic, S., Pozo, M.J., Dangott, L.J., Howell, C.R., Kenerley, C.M., 2006. Sml1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 838–853.
- Edreva, A., 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31, 105–124.
- Gajera, H.P., Katakpara, Z.A., Patel, S.V., Golakiya, B.A., 2015. Antioxidant defense response induced by *Trichoderma viride* Against *Aspergillus niger* causing collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb. Pathog.* 91, 26–34.
- Gallou, A., Cranenbrouck, S., Declerck, S., 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defense response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 219–230.
- Gharbi, Y., Barkallah, M., Bouazizi, E., Cheffi, M., Gdoura, R., Triki, M.A., 2016. Differential fungal colonization and physiological defense responses of new olive cultivars infected by the necrotrophic fungus *Verticillium dahlia*. *Acta Physiol. Plant.* 38, 242.
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.
- Gómez-Lama Cabanás, C., Schilirò, E., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J., 2014. The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. *Front. Microbiol.* 5, 427.
- Gómez-Lama Cabanás, C., Schilirò, E., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J., 2015. Systemic responses in a tolerant olive (*Olea europaea* L.) cultivar upon root colonization by the vascular pathogen *Verticillium dahliae*. *Front. Microbiol.* 6, 928.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* spp. –

- opportunistic avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiology* 2, 43–56.
- Hernández-Oñate, M.A., Esquivel-Naranjo, E.U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., Herrera-Estrella, A.H., 2012. An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14918–14923.
- Hohmann, P., Jones, E.E., Hill, R.A., Stewart, A., 2012. Ecological studies of the bio-inoculant *Trichoderma hamatum* LU592 in the root system of *Pinus radiata*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 709–721.
- Jones, J.D., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Kapat, A., Ziman, Y., Elad, Y., 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52, 127–137.
- Lehmann, S., Serrano, M., Tjamos, S.E., Metraux, J.P., 2015. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54–62.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E., Monte, E., 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 395–417.
- Lu, L., Lu, H., Wu, C., Fang, W., Yu, C., Ye, C., Shi, Y., Yu, T., Zheng, X., 2013. *Rhodospiridium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 85, 196–202.
- Martínez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C.M.J., Pozo, M.J., Ton, J., van Dam, N.M., 2016. Recognizing plant defense priming. *Trends Plant Sci.* 21, 818–822.
- Mastouri, F., Bjorkman, T., Harman, G.E., 2012. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1264–1271.
- Monteiro, V.N., Ulhoa, C.J., 2006. Biochemical characterization of a beta-1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Microbiol.* 52, 92–96.
- Monteiro, V.N., Do Nascimento Silva, R., Steindorff, A.S., Costa, F.T., Noronha, E.F., Ricart, C.A., De Sousa, M.V., Vainstein, M.H., Ulhoa, C.J., 2010. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr. Microbiol.* 61, 298–305.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Monte, E., 2011. Functional analysis of the *Trichoderma harzianum* nox1 gene, encoding an NADPH oxidase, relates production of reactive oxygen species to specific biocontrol activity against *Pythium ultimum*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3009–3016.
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., Sanfuentes, E., 2011. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. Strains to Control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* Seedlings. *Chilean J. Agric. Res.* 71, 412–417.
- Moussa, M.S., Ali, M.K., Mosa, A.A., Elewa, I.S., 2006. Root Rot disease of olive transplanted and its biological control. *Arab. J. Agric. Sci.* 14, 395–409.
- Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E., Pertot, I., 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biol. Control* 58, 74–82.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316.
- Qualhato, T.F., Lopes, F.A.C., Steindorff, A.S., Branda, R.S., Amorim Jesuino, R.S.A., Ulhoa, C.J., 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett.* 35, 1461–1468.
- Ray, D.L., Johnson, J.C., 2014. Validation of reference genes for gene expression analysis in olive (*Olea europaea*) mesocarp tissue by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Res. Notes* 7, 304.
- Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Perez, M., Chulze, S.N., Torres, A.M., 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Prot.* 26, 549.
- Ruano-Rosa, D., Prieto, P., María Rincon, A., Gomez-Rodríguez, M.V., Valderrama, R., Barroso, J.B., Mercado-Blanco, J., 2016. Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *Biocontrol* 61, 269–282.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S.L., Lorito, M., 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 291–301.
- Saiz-Jimenez, C., Miller, A.Z., Martin-Sanchez, P.M., Hernandez-Marine, M., 2012. Uncovering the origin of the black strains in Lascaux Cave in France. *Environ. Microbiol.* 14, 3220–3231.
- Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 15–26.
- Sanchez-Hernandez, M.E., Ruiz-Davila, A., Perez De Algaba, A., Blanco-Lopez, M.A., Trapero-Casas, A., 1998. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 347–357.
- Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., Mercado-Blanco, J., 2012. Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PLoS ONE* 7, e48646.
- Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmolli, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S.E., Kubicek, C.P., 2009. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* 10, 567.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., De Bolle, M.F., 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Bioch.* 46, 941–950.
- Sergeeva, V., 2011. Effect of climate on olives: frost, fire, flooding and infestations. *Aust. New Zealand Olivegrower Processor* 78, 39–41.
- Shores, M., Harman, G.E., Mastouri, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43.
- Singh, B.N., Singh, A., Singh, S.P., Singh, H.B., 2011. *Trichoderma harzianum*-mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 121–134.
- Son, S., Kim, H., Choi, G., Lim, H., Jang, K., Lee, S., Lee, S., Sung, N., Kim, J.C., 2008. Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antiomycelite activity against *Phytophthora infestans*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 692–698.
- Tae Gwan, K., Knudsen, G.R., 2013. Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *pisi*. *Appl. Soil Ecol.* 68, 57–60.
- Tian, S., Li, B., Qin, G., Xu, X., 2011. Plant host response to biocontrol agents. *Acta Hort.* 905, 73–82.
- Trabelsi, I., Oves, D., Manteca, A., Genilloud, O., Althali, A., Nour, M., 2016. Antimicrobial activities of some actinomycetes isolated from different rhizospheric soils in Tunisia. *Curr. Microbiol.* 73, 220–227.
- Triki, M.A., Priou, S., 1997. L'utilisation des traitements chimiques et biologiques pour réduire le risque de fuite de la pomme de terre causée par *Pythium aphanidermatum* en Tunisie. *Potato Res.* 40, 391–398.
- Triki, M.A., Rhouma, A., Khbou, W., Boulila, M., Ioo, R., 2009. Recrudescence du dépérissement de l'olivier causé par les champignons telluriques en Tunisie. In: *Proceeding International Conference of Olive tree and Olive Products, Olive biotech, Sfax, Tunisia: 142-147.*
- Triki, M.A., Krid, S., Hsairi, H., Hammami, I., Ioo, R., Gdoura, R., et al., 2011. Occurrence of *Verticillium dahliae* defoliating pathotypes on olive trees in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 267–272.
- van Hulst, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., Ton, J., 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 5602–5607.
- Verma, M., Satinder, K.B., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valèro, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37, 1–20.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M., 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8, 127–139.
- Whipps, J.M., 1997. Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Adv. Bot. Res.* 26, 1–134.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I., 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7343–7345.
- Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J., 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 139–150.

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

Pièces supplémentaires

Supplemental Figure S1. Statistical procedure for evaluating disease severities related to *In planta* protective effect of *T. harzianum* Ths97 against the spread of fusarium root rot disease caused by *F. solani* Fso14. Disease severity was monitored through the secondary symptoms observed on olive transplant aerial part. Aerial symptoms consisted of yellowing and chlorosis of leaves and twig dieback that ultimately browned and defoliated.

Data analysis

Statistical analyses were performed using SAS, version 9.3 (SAS Institute, Cary NC). As recommended by Shah and Madden (2004), disease severity (for fusarium root rot disease on olive transplant aerial part), assessed using an ordinal rating scale ($j = 0, \dots, 4$), was analyzed using rank-based nonparametric methods, and not with parametric techniques (such as analysis of variance). This ordinal variable was repeatedly assessed over time in the same experimental units (subjects). The experimental design is thus a repeated measures design, with two factors: treatment factor (5 levels: water control, *F. solani* Fso14, *T. harzianum* Ths97, Preventive, and Curative treatment), and factor time (8 levels). Relative effects were computed from ranks for each experimental unit (subject) over time, and then an ANOVA-type statistic (ATS) was performed by taking into account the dependencies within subject ratings. The F1_LD_F1 macro (<http://www.ams.med.uni-goettingen.de/sasmakr-de.shtml>) is used to determine the effects of treatment and time, as well the treatment×time interaction. Estimated relative treatment effects (\hat{p}_{ij}) over time with appropriate confidence limits were computed with the SAS macro LD_CI (Brunner et al., 2002). Then, the effect of time for each of the levels of treatment was tested. In addition, pairwise treatment × time interactions were tested (global pairwise comparison of disease rating curves over time); for every pair of treatments i and i' , the null hypothesis that the difference in the distributions is the same at all times was tested. A significant test result indicates that the pair of disease rating curves is different over time.

Disease severity data was also analyzed by calculating the Area Under Disease Progress curve (AUDPC), using the trapezoidal method (Madden et al., 2007), for each subject per treatment level. One-way analysis of variance (ANOVA) is used to test the significance of the fixed effect treatment on AUDPC. Residual normality as well as homogeneity of variances were tested with Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk, 1965) and Levene's test (Levene, 1960), respectively. In case of unequal residual variances, a heterogeneous variance model was fit in Proc glimmix using the random _residual_ statement with GROUP= effect option. Adjusted means were calculated and compared with Dunnett's T3 test (for an unequal variance model).

Results

Median disease ratings as well as the estimated relative treatment effects (\hat{p}_{ij}) over time were shown in **Figure 2A-B**. Disease severity increased over the 8-week assessment period for *F. solani* treatment. Test statistics for the overall effects of treatment, time, and the treatment–time interaction, were shown in **Figure S1-Table 1**. The significant interaction indicates that the treatments had different disease rating curves over time. The simple time

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

effects were significant ($p < 0.01$) for each treatment level, except for water (control) level was p slightly significant ($p = 0.02930$). This result indicates that disease rating changed over time for all treatment levels, excepting water (control) level. The ATs for the global pairwise comparisons were shown in **Figure S1-Table 2**. All disease rating curves overtime were globally different between treatment levels.

Residuals of the linear model applied to AUDPC were nearly normal (Shapiro-Wilk test : $Pr W = 0.0911$) **Figure S1A**. Homogeneity of variance assumption between treatment levels was however violated ($Pr F = 0.0088$). A heterogeneous variance model was then fit to AUDPC. The effect of treatment on this variable was highly significant ($Pr F < 0.0001$).

Effect	Analysis of variance-type statistic		
	df _N	B	p Chi-square value
Treatment	2.4819	181.73	<0.001
Time	2.41	156.45	<0.001
Treatment x time	3.556	31.532	<0.001

Figure S1-Table 1. Test statistics for the effects of *treatment* and *time* after inoculation on the disease severity induced by fusarium root rot disease on olive transplant aerial part. B = value of the test statistic ("Box-type statistic"). df_N = numerator degrees of freedom. df_D = denominator degrees of freedom is ∞ (not shown).

Treatment comparison	F	df _N	P value
water control x curative	28.685	1.5479	<0.00001
water control x <i>F. solani</i> Fso14	53.439	1.1830	<0.00001
water control x Preventive	27.192	1.4498	<0.00001
water control x <i>T. harzianum</i> Ths97	15.494	1.3818	0.00001
Curative x <i>F. solani</i> Fso14	15.02	2.7158	<0.00001
Curative x Preventive	5.8731	3.8455	0.00013
Curative x <i>T. harzianum</i> Ths97	32.753	2.8481	<0.00001
<i>F. solani</i> Fso14 x Preventive	40.458	4.2244	<0.00001
<i>F. solani</i> Fso14 x <i>T. harzianum</i> Ths97	128.16	3.0754	<0.00001
Preventive x <i>T. harzianum</i> Ths97	16.375	3.6996	<0.00001

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

Figure S1-Table 2. Tests of treatment x time interactions for pairs of treatments (i.e., global pairwise comparisons of disease rating curves over time) for fusarium root rot disease on olive transplant aerial part using analysis of variance-type statistic. The interaction of two treatments and time has an approximate F distribution under the null hypothesis of no interaction. df_N = numerator degrees of freedom. The denominator degrees of freedom (df_D) is ∞ (not shown).

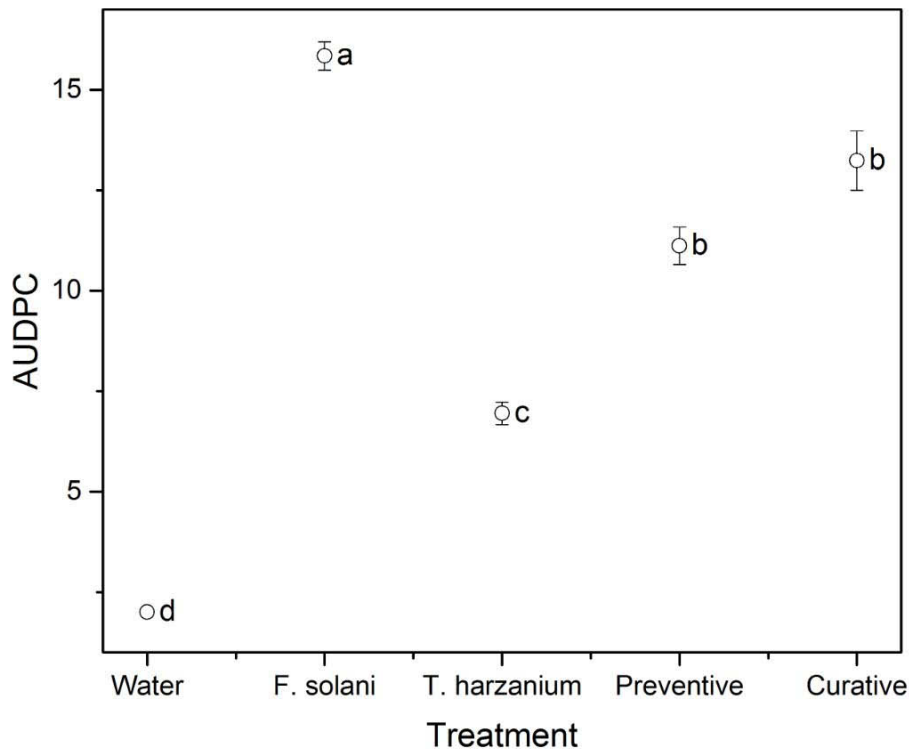


Figure S1A. Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) according to treatment level (water control, *F. solani* Fso14, *T. harzianum* Ths97, Preventive, and Curative treatment): Adjusted mean \pm SE. Points with the same letter have values which do not differ significantly by the Dunnett's T3 test, at the significance level of 5%.

Bibliography of this part

Brunner, E., Domhof, S. and Langer, F., 2002. *Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments*. Wiley, New York.

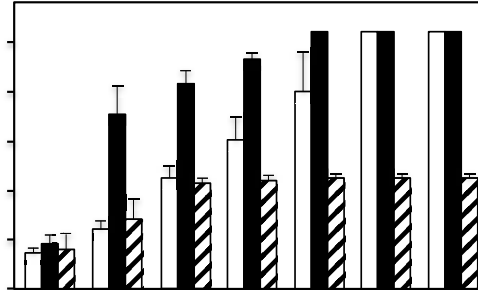
Levene, H., 1960. *Robust Tests for Equality of Variances*. In: Contributions to Probability and Statistics. I. Olkin (Ed). Palo Alto, CA: Stanford Univ. Press. pp. 278–292.

Madden L.V., Hughes, G., van den Bosch, F. (2007) The study of plant disease epidemics. The American Phytopathological Society, APS Press St. Paul, Minnesota.

Shah, D. A., and Madden, L. V., 2004. Nonparametric Analysis of Ordinal Data in Designed Factorial Experiments. *Phytopathology*, 94 (1): 33-43.

Shapiro, S. S., and Wilk, M. B., 1965. Analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52 (3/4): 591–611.

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?



Supplemental Fig. S2. Mycelial growth kinetics in dual cultures, *in vitro* (□) *F. solani* Fso14 alone, (▨) *F. solani* Fso14 growth in combination with *T. harzianum* Ths97, (■) *T. harzianum* Ths97 alone. Time course of mycelial growth in pure or dual cultures on different days after inoculation. Results are the mean diameters of mycelia colonies \pm SE, n=6; data not sharing the same letters are significantly different (Tukey post-hoc test after one-way Analysis of Variance (ANOVA), $P < 0.05$).

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

Supplementary Table S1. Primer pairs used for qPCR amplification

	Nomenclature used in this work	Accession number [JGI] / [NCBI]*	Primer sequences		Annealing [°C]
			5' to 3' / Forward	Reverse	
<i>Trichoderma harzianum</i>	18S rDNA	18StDNA -KT897696.1 *		GGTGGAGTGAATTTGCTG / CTTACTAGGGAATTCCTCG	52
	Elongation factor 1-alpha	/	146236	GCCCATTTGCTGGTTGACATG / AATTTCTGGCTGGGGTGGTG	54
	Tubulin	/	134768	GTAATAAGTTGTTCTTTGCTGTTG / CTCATTGACATAGCAATTCCTC	60
	Aquaporin	Th99286	99286	GCCAGATATGTTGTCAGGCG / GGGCCGGTGAAGAGTCCG	56
		Th98742	98742	CCGCACAGTACACCGATGCC / CTGGTAGCCCGTGAAGTCGGTG	56
		Th485859	485859	GGCCGAGCGACGATGAGG / TATCCCTGAAGCTGGCCGTC	56
	Aquaglyceroporin	Th90014	90014	GTTCTGCACTTGGCCCTGGC / CATATCCAAATCATGAAGACACC	56
		Th490850	490850	CTCTATGCTTCTGATGACGATGG / GACTTGGTGTCCATACCACATGG	56
		Th82211	82211	CTGCTTTTGTCAAAACCCAGCCG / GAGGTCCAAAATCCGGGCTGG	56
		Th92358	92358	GACCATGACATGGCTCGAAC / CCTGACCCAGGGCTCATCTCC	56
	X-Intrinsic Protein	Th488926	488926	GGCGTYTGYGTAGCAGCC / TCATCTGCTCCAGCAGTACCC	60
	<i>Fusarium solani</i> (Necha2)	18S rDNA	18StDNA -JQ837837.1 *		GTATTGCTTTGGGATGAGCT / GGCTTTTGGCCAGGAACT
Actin		/	63567	GCCATTTGCTGTTGACATG / AATTTCTGGCTGGGGTGGTG	56
Tubulin		/	98894	GAGTCTAAGCGGTTTGGATGC / GAATGCGGGTGGGCGAAGGTTG	58
Aquaporin		Necha2_90431	90431	GTGGCTGAAATACCACTAGCC / GCGAGGGGCTCATCTGGC	56
		Necha2_51592	51592	CGGCTGGCTCTGGAAACC / CCTCATGAGGACTGTCTCTG	56
		Necha2_93338	93338	GGATCTCTCATGGCTGTGGCG / CGGATCGAAGGGGACTTCCCG	56
Aquaglyceroporin		Necha2_67872	67872	GATCGGATACGGAACTGAGG / CGAGGGCGGGTCAATAGGTG	58
X-Intrinsic Protein		Necha2_72760	72760	GAATTCACAGATATGGATATGGGG / GTTCTCTTTGGTCCAGGGTGG	60

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

Faits Marquants et discussion sur ces premiers résultats

Les recherches sur l'isolement et l'identification de nouvelles souches de *Trichoderma* spp. au sein de structures agricoles et/ou horticoles de différentes zones agro-climatiques ont pour mission d'évaluer ces souches pour leurs potentiels de lutte biologique contre des agents phytopathogènes (Kredics et al., 2014). *Trichoderma* spp. fait partie des champignons qui dominent différentes rhizosphères de plantes cultivées comme celles céréalières incluant le blé (Gherbawy et al., 2004), la pomme de terre (Meincke et al., 2010), ou l'oignon (Bourguignon, 2008). La souche de *T. harzianum* *Ths97* que nous utilisons dans ces travaux de thèse est indigène, et fut isolée à partir d'un sol de champs de pomme de terre (Triki and Priou, 1997). L'utilisation de souches indigènes en lutte biologique est cruciale, car ces souches contribuent à préserver l'équilibre de l'agrosystème tout en exprimant les caractéristiques agronomiques attendues (*i.e.* phytoprotection et phytostimulation de la plante cultivée, et par effet induit, de ses performances de production). Cette souche a été alors placée en confrontation directe avec *Fso14*, soit au niveau des racines d'olivier (en situations curative ou préventive), soit *in vitro* afin de tester son pouvoir antagoniste et d'en définir son mode d'action vis-à-vis de son hôte *Fso14*.

L'effet antagoniste de *Ths97* à l'égard de *Fso14* a été testé sur de jeunes plants d'olivier, et plus spécifiquement sur le cultivar Chemlali. Ce cultivar est très sensible à *Fso14* qui déclenche rapidement des symptômes morbides très sévères avec des pourritures racinaires et des flétrissements foliaires irréversibles. D'ailleurs, les jeunes plants meurent après 4 à 5 semaines d'infestation.

L'efficacité protectrice de *Ths97* sur l'incidence de la maladie a été évaluée durant 8 semaines en suivant l'apparition des symptômes secondaires qui se manifestent par le flétrissement des parties aériennes. Quant aux symptômes primaires sur racines, lieu d'inoculation des agents fongiques, ils ont été enregistrés en toute fin d'expérience. Le traitement des racines d'olivier avec *Ths97* est très efficace : l'expression des symptômes de flétrissements aériens stoppèrent dès la 4^{ème} semaine pour disparaître rapidement dans les semaines qui suivirent. D'ailleurs de nouvelles jeunes pousses foliaires apparaissent. Cette action protectrice est d'autant plus marquée que *Ths97* est appliqué préventivement. Cependant il est important de souligner qu'une application de *Ths97* de manière curative sur des plants préalablement infestés par *Fso14* permet d'atténuer les symptômes de la maladie. En effet, aucun développement de symptômes de fusariose n'est alors diagnostiqué. Ces données sont très importantes, car elles confortent l'idée que *Ths97* serait un agent antagoniste potentiellement applicable dans un contexte curatif, à l'instar de quelques souches de *Trichoderma* déjà décrites pour limiter la pathogénicité d'autres formes spéciales (*f. sp.*) de *Fusarium* comme *f. sp. cubense* (Thangavelu et al., 2004), *f. sp. dianthi* (Shanmugam et al., 2008) ou encore *f. sp. melongena*, *f. sp. lycopersici*, *f. oxysporum*, *f. sp. niveum* et *f. sp. melonis* (Altinok et Erdogan, 2015), ou d'autres espèces d'agents phytopathogènes (Benitez et al., 2004 ; Carvalho et al., 2014). Comme exposé lors de l'introduction, plusieurs modes d'action ont été proposés pour expliquer le contrôle biologique exercé par *Trichoderma* envers certains agents phytopathogènes. Ils comprennent, notamment, une action directe par mycoparasitisme possiblement secondée par une action indirecte en stimulant les réponses de l'immunité de la plante. La première action est difficilement démontrable *in planta*. Néanmoins, le comportement de *Ths97* sur *Fso14* quand ces deux souches sont cultivées ensemble sur un milieu artificiel nous a permis de mettre en lumière quelques faisceaux d'indices très intéressants.

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

Dans un premier temps, *Ths97* présente une dynamique de croissance plus rapide que *Fso14*, lui permettant d'être *a priori* plus compétitif spatialement notamment pour l'appropriation des nutriments. Ensuite, *Ths97* exprimerait un comportement mycoparasitaire directe sur *Fso14*. En effet, lorsque les deux champignons se développent sur un même milieu de culture, un prélèvement de mycélium au niveau de la zone de confrontation montre que les filaments de *Ths97* s'imbriquent parmi ceux de *Fso14* avec de nombreux événements d'accolement et d'enroulement. De même, de fins prolongements mycéliens de *Ths97* se terminant par des papilles adsorbées sur les filaments de *Fso14* ont été observés. Ces structures entre mycéliums sont considérées comme des caractéristiques comportementales typiques d'un acte de mycoparasitisme (Benitez et al., 2004). Il est donc raisonnable d'avancer que *Ths97* rentre en contact physique avec *Fso14* et en soutire les nutriments nécessaires à sa vie. En conséquence de quoi, *Fso14* présente un développement définitivement stoppé. Par extension, ces données certes obtenues *in vitro* nous laissent penser que parmi les mécanismes proposés par *Ths97* qui participeraient à la protection des oliviers contre l'agent phytopathogène *Fso14*, certains seraient directs et associés à des actions de compétition et de mycoparasitisme.

En plus de ces actions directes exercées par l'agent bénéfique sur l'agent phytopathogène, la bioprotection de *Ths97* peut également être associée à des actions indirectes. En effet, la présence de *Trichoderma* provoque de multiples réponses de la part de la plante, dont une activation des systèmes de défense inductibles de la plante qui participent ainsi à établir une meilleure résistance systémique et/ou localisée de ces plants (Yedidia, 2000 ; Brunner et al., 2005 ; Hibar et al., 2005 ; Shores et al., 2010 ; Perazzoli et al., 2012). Cette résistance est spécifiquement nommée "résistance systémique induite" ou ISR (Induced Systemic Resistance) dès lors où elle correspond au renforcement de la capacité défensive de l'hôte induit par des agents non phytopathogènes (dans le cas des champignons, les Plant Growth-Promoting Fungi ou PGP-F) (Kojima et al., 2013). Nous émettons l'hypothèse que *Ths97* intégrerait ces PGP-F. Par conséquent, sur les plants ayant servi à démontrer l'effet protecteur de *Ths97*, nous avons exploré l'établissement des résistances locales (donc racinaires) à travers la modulation de gènes codant des protéines enzymatiques impliquées dans quatre voies majeures de défense chez le règne végétal : le stress oxydatif, la voie des phénylpropanoïdes, les PR-protéines, et la régulation du statut phytohormonal impliquant les salicylates, les jasmonates et l'éthylène. Les patrons transcriptionnels enregistrés dans les différentes conditions biologiques sont très informatifs.

En premier lieu, et pour la majorité des gènes de défense, *Ths97* et *Fso14* induisent des accumulations de transcrits très contrastées : globalement activées pour *Ths97* (bien qu'assez faiblement) et assez fortement inhibées pour *Fso14*. Ces tendances d'expression différentielles pourraient s'expliquer par la capacité spécifique de chaque agent, qu'il soit bénéfique ou pathogène, à pouvoir activer ou réprimer respectivement des voies de défenses végétales non spécifiques. A l'instar de pathosystèmes qui répondent à une interaction compatible (Alba et al., 2011), *Fso14* établirait activement des liens très spécifiques avec sa plante hôte, ici l'olivier, afin de supprimer certaines défenses qui lui seraient potentiellement néfastes. Quant à *Ths97*, l'agent bénéfique, la plante semble le reconnaître et déclenche une légère accumulation de ses transcrits de défenses. Il est délicat de corréler des niveaux d'expression transcriptionnelle à des niveaux d'accumulation de molécules défensives. Néanmoins et à l'instar de ce qui est couramment observable dans d'autres relations où des agents *Trichoderma* sont aptes à accumuler des molécules de défenses (Yedida et al., 1999), nous pouvons émettre l'hypothèse que des défenses

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* che l'olivier?

s'accumulent aussi dans les racines d'olivier lors de l'installation de *Ths97*. Il est donc intéressant de souligner l'aptitude de *Ths97* à pouvoir surmonter certaines d'entre elles. Mais de manière générale, les mécanismes adaptatifs déployés par les *Trichoderma* afin d'exprimer un tel avantage, c'est-à-dire la tolérance et/ou la métabolisation des molécules de défense des plantes, sont relativement peu compris.

En second lieu, lors d'une situation de confrontation de *Ths97* sur *Fso14*, ces réponses défensives sont significativement potentialisées. En d'autres termes, la configuration tripartite induit dans les racines d'olivier une accumulation plus élevée en transcrits de gènes de défense par rapport à une inoculation avec *Ths97* seul. Ces réponses transcriptionnelles très particulières laissent entrevoir une possible mise en alerte des plants d'olivier, concept physiologique qualifié de "priming" (Martinez-Medina et al., 2016). Ce phénomène de "priming" est couramment recherché dans des contextes systémiques d'élicitation de défenses (ISR et SAR), consécutif à un traitement soit avec des agents microbiens biostimulateurs soit avec des éliciteurs biotiques ou abiotiques (Conrath et al., 2006; Verhagen et al., 2004; Beckers et Conrath 2007; Ton et al., 2007). Nos résultats démontreraient que le "priming" fait également partie intégrante des réactions de défense localisées au niveau des tissus infestés chez l'olivier, que nous qualifierions d'"ILR" (Induced Local Resistance). A l'instar de l'ISR, "l'ILR" serait associée à des changements "mineurs" dans l'expression des gènes de défenses chez l'hôte, et ce tant que le pathogène n'est pas introduit (Pieterse et al., 2002 ; Hase et al., 2003 ; Verhagen et al., 2004). L'hypothèse fonctionnelle pour expliquer ces niveaux de réponses physiologiques particuliers serait que le BCA est "reconnu" comme un agent non nuisible, instaurant la relation dans un contexte non infectieux mais où sa présence doit être juste contenue (probablement en lien avec les élévations des défenses végétales faibles mais significatives). Cette relation ne nécessite donc aucunement l'explosion des défenses de l'hôte sachant que de telles réponses cellulaires impliqueraient des investissements très lourds au niveau des ressources métaboliques et énergétiques de l'hôte végétal au détriment du maintien de processus fondamentaux telles la photosynthèse et la croissance (van Hulst et al., 2006). Mais ces réponses de défense s'exacerbent plus rapidement et fortement chez les plantes pré-stimulées lorsqu'elles sont ensuite infestées par leurs agents phytopathogènes dont l'activité de virulence aurait plutôt provoqué l'inhibition de ces mêmes défenses. Dans notre relation tripartite, cette situation est particulièrement éloquente pour les racines d'oliviers qui sont préventivement colonisées avec *Ths97*, et cela pourrait expliquer la réduction plus rapide de la gravité de la maladie par rapport au contexte curatif. Des travaux ont démontré que certaines souches de *Trichoderma* ont l'aptitude de mettre en alerte des plantes cultivées, les protégeant contre différents agents pathogènes (Yedidia et al., 2003, Van Hulst et al., 2006 ; Perazzolli et al., 2011). Cependant, le "priming" est une fonction physiologique encore peu étudiée, et les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore très mal compris (Bruce et al., 2007 ; Martinez-Medina et al., 2016). Et pourtant, leur décryptage aiderait à mieux comprendre les mécanismes globaux rendant apte les plantes à enregistrer des informations, notamment liées à son immunité générale, et consécutives à la reconnaissance d'agents biostimulateurs. Parce que le "priming" offrirait de nombreux avantages en termes de coût énergétiques qui s'expriment pleinement quand une maladie survient, plusieurs auteurs soulignent la nécessité d'utiliser des plantes "primées" comme une stratégie très prometteuse dans la gestion de nombreuses maladies (Van Hulst et al., 2006 ; Perazzolli et al., 2011).

En conclusion à ce premier chapitre, l'ensemble de ces premiers travaux démontre

Question 1 *Trichoderma harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *Fusarium solani* chez l'olivier?

clairement que (i) la souche de *T. harzianum* Ths97 peut être vue comme un mycoparasite vis-à-vis d'une souche phytopathogène de *F. solani* très agressive sur de jeunes plants d'olivier, Fso14, (ii) qu'elle est apte à protéger les plants d'olivier contre le développement de la maladie, et (iii) qu'elle induit localement des réponses de défenses cellulaires car elle est reconnue par la plante, mais aussi et surtout qu'elle est apte à mettre en alerte la plante qui exprime ses réponses de défenses avec une grande intensité lors d'une infection par Fso14.

Nous considérons que l'ensemble de ces résultats valide notre première hypothèse et nous conforte dans l'idée que des solutions alternatives à l'emploi de pesticides dans la lutte contre les fusarioses chez l'olivier existent. Les perspectives à ce travail seront apportées en fin de mémoire (chapitre 5).

4

Chapitre



Question 2

Les perméases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum* ?

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

Préambule

Les premiers travaux accomplis dans cette thèse et présentés dans le chapitre précédent démontrent que la souche de *T. harzianum* Ths97 possède des potentialités certaines pour protéger l'olivier contre les attaques de la souche phytopathogène de *F. solani*, Fso14. Parmi les modes d'actions des *Trichoderma* spp. décrits pour être très complexes car ils font appel à la plupart des mécanismes connus de l'antagonisme microbien, Ths97 agirait *a priori* directement comme un agent hyperparasite, et indirectement en activant les systèmes de défense des racines d'olivier.

Cette première aptitude d'hyperparasitisme a attiré tout particulièrement notre attention. Elle peut être résumée en trois actes : l'attaque (enzymes hydrolytiques, mycotoxines etc), l'autodéfense (mécanismes antioxydants et de détoxications etc), et la nutrition. Les deux premiers actes sont relativement bien étudiés, contrairement au dernier acte pour lequel les données bibliographiques sont très succinctes, voire paradoxalement passées sous silence.

Tous les champignons sont chimiohétérotrophes à bon nombre d'éléments atomiques tel le carbone, c'est-à-dire qu'ils puisent leur énergie à partir des molécules carbonées récupérées dans leur environnement. Ces sources de matière proviennent de différentes origines, et leur mode d'appropriation conditionne les différents modes de nutrition et donc les différents modes de vie de ces organismes. Les *Trichoderma* spp. sont généralement présentés comme des organismes saprotrophes (même si des formes pathogènes ou endophytes existent). Ils se nourrissent d'une matière organique dégradée issue d'organismes morts. Durant des situations très particulières, telles celles rencontrées durant cette thèse, certains *Trichoderma* spp. peuvent devenir hyperparasites et tirer profit du métabolisme d'autres organismes fongiques eux-mêmes pathogènes. Mais quel que soit le mode de vie, tous les champignons (et notamment *Trichoderma*) s'appuient sur des processus trophiques d'osmotrophie. L'osmotrophie correspond à des transferts de solutés sans déformation de membranes (par opposition à la phagotrophie). Ces transferts s'opèrent en théorie par gradient de concentrations, mais les biomembranes étant quasi imperméables aux ions et petits solutés chargés, ces transferts sont facilités par la mise en place de tout un réseau de transporteurs protéiques transmembranaires. Quelques recherches ont permis de comprendre l'implication de plusieurs familles protéiques apparentées à des transporteurs dans l'établissement d'une relation parasitique impliquant des cryptogames et leurs plantes hôtes. Cependant, aucune ne cible spécifiquement la famille des Major Intrinsic Protein (MIP). De plus, la diversité des MIP au sein d'agents fongiques non mycorrhiziens et plus précisément chez des champignons mycoparasitaires ainsi que leur implication dans un contexte nutritif sont aujourd'hui totalement inconnues.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à déterminer si les MIP pouvaient avoir un rôle dans les relations trophiques d'un agent hyperparasite tel *T. Harzianum*. Nous avons débuté par dresser un inventaire exhaustif des membres MIP au sein du genre *Trichoderma* afin d'en évaluer leur diversité. Ensuite, nous avons analysé les patrons d'expression transcriptionnelle de chaque membre lors des situations physiologiques d'installation des champignons sur racines d'olivier ou en culture artificielle (PDA), ainsi qu'en inoculations séparées ou en co-inoculations répondant au contexte de mycoparasitisme soulevé dans le chapitre 1. Cependant, les profils d'expression enregistrés et corrélés aux facultés de transport théoriques des MIP exprimées n'autorisent pas de définir leur fonction dans l'organisme. Aussi, nous avons déterminé les motifs *cis*-régulateurs qui sont présents dans leurs régions promotrices.

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

Ces régions sont très informatives car elles peuvent renseigner sur les voies de régulations qui gouvernent leur modulation et donc, indirectement, leur possible implication dans des réseaux de protéines impliquées dans l'établissement de réponses cellulaires particulières. Enfin, les structures tertiaires (tridimensionnelles) des MIP transcrites ont été modélisées. Cette approche nous renseigne sur la structure générale des MIP de *Trichoderma*, mais surtout sur la possibilité que certains solutés puissent pénétrer dans le pore voire d'être autorisés à y circuler afin d'être acheminés de part et d'autre d'une biomembrane, ainsi que de définir des points de régulation potentiels à l'intérieur du pore et qui seraient majeurs dans les aptitudes de diffusion de ces MIP vis-à-vis de ces différents solutés.

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

PLoS ONE

PLoS ONE 13 (2018) 1-23.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760>

MIP diversity from Trichoderma: structural considerations and transcriptional modulation during mycoparasitic association with Fusarium solani in olive trees

Maroua BEN AMIRA¹², Robin MOM¹, David LOPEZ¹, Hatem CHAAR³, Ali KHOUAJA⁴, Valérie PUJADE-RENAUD¹⁶, Boris FUMANAL¹, Aurélie GOUSSET¹, Gisèle BRONNER⁵, Philippe LABEL¹, Jean-Louis JULIEN¹, Mohamed Ali TRIKI⁷, Daniel AUGUIN^{8*}, Jean-Stéphane VENISSE^{1*}

¹UCA, UMR PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

²Faculté des Sciences de Bizerte, 7021 Zarzouna, Tunisie;

³National Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Crop Improvement Laboratory, INRAT-Tunisia;

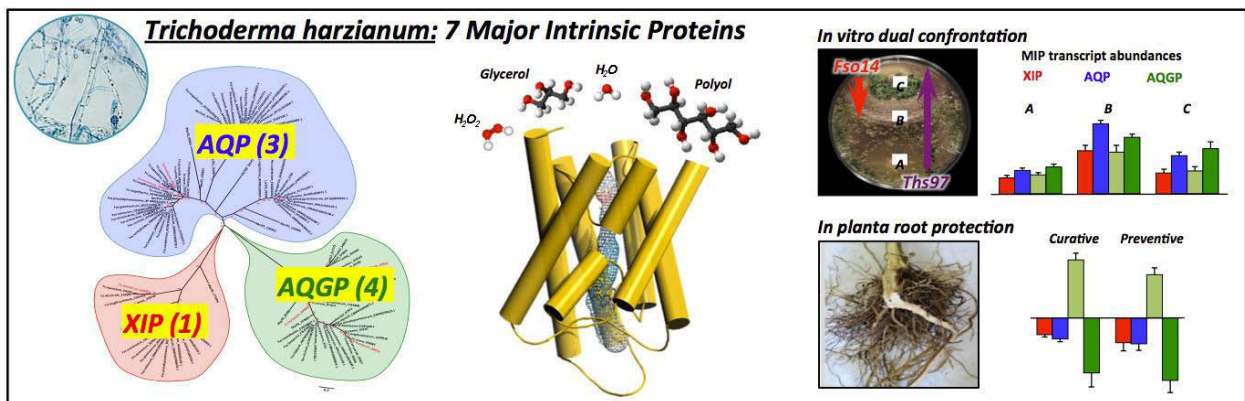
⁴National Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka, Tunisia;

⁵Université Clermont Auvergne, UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

⁶CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

⁷Institut l'Olivier, LR: Amélioration et Protection des Ressources Génétiques de l'Olivier-Université de Sfax, Tunisia;

⁸Université d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, INRA-USC1328, F-45067 Orléans, France.



Diversity and plausible permease ability of major intrinsic proteins (or aquaporins) in *Trichoderma harzianum*, and transcriptional expression during mycoparasitism activity against the causative pathogenic agent of fusarium root rot in olive trees, *Fusarium solani*

- Eight MIP are present in *T. harzianum* genome including 1 XIP, 4 AQGP and 3 AQP.
- Several structural checkpoints likely determine transport specificity.
- Four MIP (1 XIP, 2 AQGP and 1 AQP) are transcribed during mycoparasitism activities.
- Most of the MIP promoter cis-regulatory motifs concern carbon and nitrogen metabolisms.

RESEARCH ARTICLE

MIP diversity from *Trichoderma*: Structural considerations and transcriptional modulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* olive trees

Maroua Ben Amira^{1,2}*, Robin Mom¹*, David Lopez¹, Hatem Chaar³, Ali Khouaja⁴, Valérie Pujade-Renaud^{1,5}, Boris Fumanal¹, Aurélie Gousset-Dupont¹, Gisèle Bronner⁶, Philippe Label¹, Jean-Louis Julien¹, Mohamed Ali Triki⁷, Daniel Auguin^{8*}, Jean-Stéphane Venisse^{1*}

1 UCA, UMR PIAF, Clermont-Ferrand, France, 2 Faculté des Sciences de Bizerte, Zarzouna, Tunisia, 3 National Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Crop Improvement Laboratory, INRAT, Tunis, Tunisia, 4 National Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka, Tabarka, Tunisia, 5 CIRAD, UMR AGAP, Clermont-Ferrand, France, 6 Université Clermont Auvergne, UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France, 7 Institut de l'Olivier, LR: Amélioration et Protection des Ressources Génétiques de l'Olivier-Université de Sfax, Sfax, Tunisia, 8 Université d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, INRA-USC1328, Orléans, France

* These authors contributed equally to this work.

* auguin@univ-orleans.fr (DA); j-stephane.venisse@uca.fr (JSV)



OPEN ACCESS

Citation: Ben Amira M, Mom R, Lopez D, Chaar H, Khouaja A, Pujade-Renaud V, et al. (2018) MIP diversity from *Trichoderma*: Structural considerations and transcriptional modulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* olive trees. PLoS ONE 13(3): e0193760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760>

Editor: Vijai Gupta, Tallinn University of Technology, ESTONIA

Received: July 13, 2017

Accepted: February 17, 2018

Published: March 15, 2018

Copyright: © 2018 Ben Amira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the PHC program "Uthic" from Campus France (grant 34861PF) under the joint aegis of the Tunisian Ministry of Foreign Affairs and the French Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Major intrinsic proteins (MIP) are characterized by a transmembrane pore-type architecture that facilitates transport across biomembranes of water and a variety of low molecular weight solutes. They are found in all parts of life, with remarkable protein diversity. Very little is known about MIP from fungi. And yet, it can legitimately be stated that MIP are pivotal molecular components in the privileged relationships fungi enjoy with plants or soil fauna in various environments. To date, MIP have never been studied in a mycoparasitism situation. In this study, the diversity, expression and functional prediction of MIP from the genus *Trichoderma* were investigated. *Trichoderma* spp. genomes have at least seven aquaporin genes. Based on a phylogenetic analysis of the translated sequences, members were assigned to the AQP, AQGP and XIP subfamilies. In *in vitro* and *in planta* assays with *T. harzianum* strain *Ths97*, expression analyses showed that four genes were constitutively expressed. In a mycoparasitic context with *Fusarium solani*, the causative agent of fusarium dieback on olive tree roots, these genes were up-regulated. This response is of particular interest in analyzing the MIP promoter *cis*-regulatory motifs, most of which are involved in various carbon and nitrogen metabolisms. Structural analyses provide new insights into the possible role of structural checkpoints by which these members transport water, H₂O₂, glycerol and, more generally, linear polyols across the membranes. Taken together, these results provide the first evidence that MIP may play a key role in *Trichoderma* mycoparasitism lifestyle.

Introduction

Most crop farmers are confronted with the need to control various diseases (physiological or parasitic), while trying to meet strong consumer demands to use environment-friendly farming methods. One option is to use members of the fungus genus *Trichoderma*, most of which are now known to be effective antagonists of a broad array of soil-borne pathogens [1]. We recently showed that a strain of *T. harzianum* (*Ths97*), isolated from Tunisian farmlands, expressed antagonist activities against a strain of *Fusarium solani* (*Fso14*), which causes severe dieback of olive roots in Tunisia [2]. *Fusarium* root rot diseases are steadily expanding worldwide in nurseries and young olive groves, and disease control is still limited to systemic fungicide treatments and prophylactic actions. By analogy with different tripartite pathosystems that include some *Trichoderma* spp. as mycopesticides, *Ths97* is thought to act as a necrotrophic myco-hyperparasite, stopping *Fso14* growth in *in vitro* through the development of contact structures, namely helicoidal structures around its host, papilla-like structures and the collapse of several *Fso14* septa. Furthermore, on olive trees, *Ths97* develops substantial protective activity against *Fusarium* root infestation. This bioprotection is correlated with the up-regulation of an array of plant defense-related pathways by *Ths97*.

Trichoderma spp. occur as ubiquitous common agents in most soils, and in a few cases, they are also competitive saprotrophs, opportunistic parasites of other organisms (animals, plants or fungi), and possibly endophytes/symbionts of plants [3]. In a competitive context within an rhizospheric ecosystem, like other chemo-heterotroph mycoparasites (whether or not they are classified as a biological control agent or BCA), *Trichoderma* spp. weave an intimate network of nutritional links with their close partners, most relevantly here the plant [the olive tree] and its prey [the phytopathogen *F. solani*]. Even today, most studies on mycoparasites (*lato sensu*) focus exclusively on the mechanisms of attack and/or self-defense in plants [4]. Feed mechanisms are rarely mentioned or only very cursorily. Yet they are crucial to the relationship between myco-hyperparasites and other living organisms. Some aspects of this physiological pathway need to be more fully understood.

Parasite growth depends on the retrieval of a countless number and variety of nutrients from host organisms. They are mainly water, inorganic solutes, and a plethora of nitrogen and carbon organic precursors, such as carbohydrates, amino acids, fatty acids, and nucleosides. Internalizing external food, when it occurs without membrane deformation (*ie* endocytosis), is made possible by an abundant arsenal and diverse protein groups of plasma membrane transporters. This group includes the major intrinsic proteins (MIP) [5]. MIP are a large transporter superfamily generically designated as “aquaporins” (AQP). They facilitate the selective bidirectional transport of water and small uncharged molecules across biological membranes [6]. Structurally, AQP share classic folded topology and channel architecture lending them an hourglass shape. The overall three-dimensional design of the integral membrane region has a two-fold symmetry consisting of six transmembrane α -helices with five internal loops. A seventh pseudo-transmembrane helix is formed by two smaller hemi-helical segments (in the middle of loop B and loop E segments) that project opposing “NPA” boxes (Asn-Pro-Ala) at the center of the structure. The pore formed by the packing of these seven helices displays this hourglass aspect, in which the narrow constriction determines transport selectivity based on solute size and hydrophobicity [7]. A second major determinant for substrate specificity is located in the outer channel vestibule, and is referred to as the ar/R (aromatic/arginine) selectivity region [8, 9]. This feature consists of a tetrad of amino acid residues, one from each of the transmembrane helices 2 [H2] and 5 [H5], and two from the inter-helical loop containing the second “NPA” box [LE1 and LE2]. “NPA” boxes and the ar/R filter regulate the single-file conductance of water and molecules by acting as a cation- and proton-excluding selectivity

filter. These physicochemical and thermodynamic contexts determine which molecules can cross the pore.

With an increasing number of genome sequences available, MIP genes have now been fully described across all living organisms, except for some thermophilic Archaea and intracellular bacteria [10]. Despite its overall diversity, the MIP family can be functionally divided into two major phylogenetic divisions, separating the water-selective AQP (*i.e.* the water-specific and the orthodox AQP) from the glycerol facilitators or aquaglyceroporin (GIFp) [11]. In fungi, MIP nomenclature is established on that of yeasts, and resembles that of vertebrates [12, 13]. Phylogenetic analysis finds three main groups with possible subdivisions: classical aquaporins (AQP), fungal XIP, and aquaglyceroporins (AQGP) subdivided into Fps-like AQGP, Yfl054-like AQGP and "other" aquaglyceroporins [12, 14, 15, 16].

While aquaporins have been the subject of intensive study mostly in vertebrates and plants concerning their transport specificity and their direct or indirect involvement in controlling homeostasis, their precise role in various challenged environments is still not entirely understood in most eukaryotes. This is particularly true for fungi for which MIP structure, functions and regulation are less studied, beyond several closely related models of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts [12], two Basidiomyceta and ectomycorrhiza fungus *Glomus intraradices* [16, 17] and *Laccaria bicolor* [15], and the Ascomyceta *Aspergillus glaucus* [18]. Even so, the general lack of fungus MIP data is surprising, given the large number of fungus species and their diverse physiology and ecology niches that are always connected with water and a broad range of solutes. Remarkably, MIP from fungal mycoparasites have never been comprehensively and specifically explored.

In this study, the tripartite myco-phytopathosystem [*T. harzianum* *Ths97*–*F. solani* *Fso14*–olive trees] was used to gain insight into the molecular mechanisms involved in cell uptake of essential nutrients, by focusing specifically on the MIP route. We first investigated MIP diversity in the genus *Trichoderma*, and monitored the transcriptional expression patterns of these MIP in a situation of mycoparasitism involving the *T. harzianum* *Ths97* strain and *F. solani* *Fso14* strain, both *in vitro* and in olive trees (either preventively in primed plants or curatively in diseased plants). Second, we depicted the protein structure of the MIP expressed by modeling, and hypothesized its ability to transport water, H₂O₂ and glycerol. In addition, the possibility that particular solutes such as small carbohydrates may be transported across these MIP is discussed. In brief, our data provide the first comprehensive information concerning the MIP superfamily in the Ascomyceta genus *Trichoderma* and their potential involvement in a mycoparasitism context. We go on to discuss our findings with a special focus on the trophic behaviors that *Trichoderma* sets up in its habitat, which remain almost unknown in a situation of mycoparasitism.

Materials and methods

Fungal strains and plant material

Both the *Trichoderma harzianum* strain *Ths97* and the soil-borne *Fusarium solani* strain *Fso14* (accession number KU863548) were isolated from private Tunisian farmlands, with the permission and the help of the owner of the land, and registered at the "Institut de l'Olivier" (University of Sfax, Tunisia) [19]. Fungi were grown on PDA plates at 25°C and 27°C for *Fso14* and *Ths97*, respectively. The cultivar *Olea europaea* cv. *Chemlali* obtained from herbaceous cuttings of two-year-old plants were used for assays because of their high susceptibility to *Fso14* [20, 2]. Plants were planted in plastic bags containing autoclave-sterilized sandy clay soil, and kept in a controlled growth chamber with the following growth parameters: 16h photoperiod, 26/23°C (day/night), relative humidity around 70%, and regular irrigation.

Root inoculations were performed for 1 hour by placing the roots in the conidia suspensions (S2 Fig). After inoculation, plants were replanted in plastic bags containing new soil. For the confrontation assays, *Ths97* and *Fso14* were inoculated successively with 6 days apart. The preventive assay corresponded to plants inoculated with *Ths97* in the first step, and the curative assay to plants inoculated with *Ths97* in the second step. The number of biological repetitions was: $n = 6$ for water control plants, $n = 9$ each for *Ths97* and *Fso14* infested plants, and $n = 18$ each for curative and preventive treatments. After eight weeks of infestation, roots were carefully harvested and randomly pooled in three samples in terms of biological conditions, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until needed for molecular analyses. Concerning the *in vitro* confrontation tests, two mycelial plugs (8 mm diameter) were cut from the edge of actively growing cultures of *Ths97* and *Fso14* respectively, and placed 4-cm apart in a new PDA plate (S3 Fig). The paired cultures and control cultures (*Fso14* alone) were incubated at 27°C in the dark and sealed with Parafilm. The biological repetitions were done in triplicate, and each zone of interest was carefully harvested, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until needed for molecular analyses. Statistical analyses of *in planta* and *in vitro* dual tests were carried out using rank-based non-parametric and ANOVA parametric methods, respectively. These analyses are detailed in [2]. All experiments for this study with the strains were done at the "Institut de l'Olivier" under the supervision of Dr TRIKI Mohamed Ali.

Bioinformatic analysis

Protein sequences homologous to MIP transporters from *Trichoderma* spp. were retrieved at the Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/>). Some new sequences were also identified by tBLASTn searches against the NCBI GenBank GSS databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). These investigations were conducted using keyword queries (IPR000425; Major Intrinsic Protein; Aquaporin) and tblastn searches (with conservative criteria requiring a cut-off of E -value of 1.0^{-5}). For all *in silico* analyses on *T. harzianum*, *T. harzianum* strain CBS 226.95 v1.0 (from JGI) was used as reference. Protein names and accession numbers are listed in S1 Table. During retrieval, each MIP member was verified by predicting the transmembrane topology with Interproscan from EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). Molecular modeling of MIP from *T. harzianum* was performed with the I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement) program suite [21, 22, 23]. Electrostatic potentials were established in a PARSE forcefield [24] using the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver [25] in PyMOL [26], which was used to analyze and illustrate the molecular models. Structural alignment was generated with mulPBA [27]. MOLE-2 was used to define the central pores in terms of radius and polarity. Amino acid sequences were aligned using MUSCLE [28]. Phylogenetically informative positions were selected using Gblocks [29], and maximum likelihood phylogenetic reconstructions were made with PhyML (v3.0) [30] using the WAG substitution model, bootstrap supports with 500 replicates and default parameters. Tree was carried out using maximum likelihood and the phylogenetic tree was visualized with TreeDyn [31]. Theoretical isoelectric point (pI) and molecular weight (Mw) were calculated with the Compute pI/Mw tool (expasy.org/compute_pi/). Putative transcription factor binding sites (TFBSs) were analyzed on MIP genes from *T. harzianum* that were expressed in our biological conditions. Promoters were retrieved by searching the JGI database on sequences from *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 that corresponded to the 1.5Kb of the genomic sequence upstream of the initiation codon. TFBSs were detected with the Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*, SCPD (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>; [32]), and the putative biological processes (GO) were identified with SCPD and the Universal Protein Resource Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

RNA isolation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA was extracted as previously described by [33]. Mycelia from *in vitro* cultures and infected root tissues were ground to a fine powder in liquid nitrogen and transferred to 1 ml of lysis CTAB extraction buffer (bromide cetyltrimethylammonium). The homogenate was incubated for 5 min at 65°C, and treated twice with 1 volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). The supernatant was collected and treated overnight in 2M of LiCl at -20°C. The precipitate was collected by centrifugation (16,000g for 45 min) and washed with 80% ethanol. The pellet was dissolved in 25 µl of water (DEPC) and then treated with 1U of RNase-free RQ1 DNase (Promega, Madison, WI, U.S.A.) for 30 min to remove contaminating genomic DNA. After two chloroform:isoamyl alcohol (24:1) washes, total RNA was precipitated with 100% ethanol (2V) for 2 hours at -20°C. After centrifugation at 16,000g for 30 min, the pellet was washed with 80% ethanol, dissolved in 50 µl of water (DEPC), and stored at -80°C for later analysis. RNA concentrations were determined by spectrophotometry at OD 260/280 (spectrophotometer ND-1000, Nanodrop, France), and quality was checked by using 2% TAE/agarose electrophoresis. Two µg of total RNA were reverse-transcribed into cDNA with Oligo-dT using the SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). cDNA was diluted 10-fold with sterile water, and used as a template for qPCR. The abundance of MIP-related transcripts was determined by real-time qPCR with a MyiQ instrument (Bio-Rad). MIP gene expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [34]. PCR amplifications were done in 15 µL of PCR reaction using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec) from 2 µl of cDNA template. Cycle parameters were 94°C for 30s, followed by 35 cycles at 94°C for 15s, at 58°C for 15s, and 72°C for 20s. PCR reactions were ended by generating a dissociation curve to confirm the amplification of PCR single bands. Geometric mean of C_t related to genes encoding to *tubulin* (*Th*, protein ID: 516507; *Fs*, 98894; JGI; [35]), *18SrRNA* (*Th*, sequence ID: KT897696.1; *Fs*, JQ837837.1; NCBI) and according to the strain, genes encoding actin (*Fs*, protein ID: 63567; JGI) or *elongation factor 1-alpha* (*Th*, protein ID: 146236; JGI; [36]) were used as internal references to normalize MIP expression for their stable constitutive expressions during fungus development and infestation. Specific primer pairs for each MIP member were designed in consensus zones after alignment of MIP sequences retrieved from *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. with Primer3-plus application (<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>). Specific amplification of only one desired band was observed using each primer combination for qRT-PCR analysis. Primer pairs are listed in S2 Table. All PCR technical samples were assayed in triplicate, and reactions were carried out with three biological replicates. For statistical analysis, data were analyzed using a parametric method on STATISTIX V8 software where aquaporin steady-state gene expression levels were computed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's honest significant difference (HSD) *post hoc* test ($p < 0.05$).

Results and discussion

Originality of the topic

In major ongoing research in molecular plant pathology, the characterization of virulence factors that underpin host-pathogen interactions is still a topical issue. Pathogens deploy an array of effectors that intrinsically constitute their "cell architecture" or which are secreted into the surrounding environment to interfere with host cell processes. By extension, during a situation of pathogenicity, all solute transporters may be regarded as virulence factors, since they are involved in controlling the entry into the cell of molecules with nutritive value, notably when they originate from the host prey. Because MIP play major roles in numerous physiological processes, it is meaningful to consider these channels as pathogenic factors. The genus

Trichoderma offers us an opportunity to study this subfamily in a tripartite mycoparasitic context [*T. harzianum*/*F. solani*/olive trees] [2].

MIP diversity

In order to characterize the MIP family from *Trichoderma*, the genome databases NCBI and JGI were searched using the previously described MIP translated sequences from *Trichoderma virens* and *Nectria haemotococca* (asexual name of *Fusarium solani*) [15]. The different *Trichoderma* strains encode six to eight predicted MIP, while *Fusarium* strains encode six predicted MIP except for *F. solani* with five members, and *F. oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with seven members each (S1 Table).

T. harzianum and *F. solani* (*Nehca2*) exhibited eight and five predicted MIP, respectively. A random analysis of this MIP family from diverse fungi (JGI) showed an average of five MIP members, placing *Trichoderma* among those species that share the broadest range. Phylogenetic relationships among the *Trichoderma* and *Fusarium* MIP proteins were analyzed with classified orthologs from *Laccaria bicolor* and *Mycosphaerella fijiensis* [15] as a reference. Sequences fall into three major clades: the classical aquaporins (AQP), aquaglyceroporins (AQGP) and X-intrinsic proteins (XIP) (Fig 1). Specifically, *Trichoderma* shows three classical AQP, three AQGP (two Fps-like and one "other" AQGP) and a single XIP. Amino acid conservation ranges from 40% to 54% sequence identity in AQP, from 40% to 54% sequence identity within AQGP, and from 76% to 87% sequence identity in XIP. By comparison, *Fusarium* exhibits three classic AQP, one AQGP (Fps-like) and likewise a single XIP. However, unlike *Fusarium*, AQP present in *Trichoderma* were split into three sub-groups, and AQGP into four sub-groups with three Fps-like and one "Other aquaglyceroporin" branches. All the XIP coalesced into a major clade, which can be divided into two branches. Although fewer subgroups are met in fungi than in plants, the emergence of a structural diversity is highlighted. Moreover, whatever the number of MIP members from each species, there is invariably a genus-dependent subfamily distribution. Despite the common lineage of these two fungi (class of Sordariomycetes), these MIP differences in each subgroup may result from independent rounds of gene events such as duplications, but without excluding possible gene losses. For the *Trichoderma* genus, however, the limited number of differences between MIP sequences has not provided a clear-cut answer to the question of MIP expansion. At least one duplicated event seems to have occurred in *T. harzianum* and concerns the aquaglyceroporin 82211, absent in the ancestral species *T. reesei*. Gene duplication plays a key role in increasing genetic variability (driving an increase in the sizes of gene families, and *in fine*, the genome expansion of species), but most importantly, these genomic events create novel genes, which may confer potential new adaptation abilities. Here, such a relative conservation in a MIP subfamily in the *Trichoderma* genus suggests that each MIP member is devolved to transporting particular solutes that are pivotal in the full cycle of fungus development.

Additionally, insofar as these subfamilies (AQP, AGP and XIP) are expected to transport different solutes [16], the strong diversity and the large number of AQGP specifically observed in *Trichoderma* probably reflect the divergences in the adaptation of this fungi to contrasting niches and/or infection processes in a specific host range of organisms completely different from that for *Fusarium*. This differentiates *Trichoderma* from *Fusarium* in their respective mycoparasitic and necrotrophic lifestyles. While still hypothetical, it is nevertheless possible that a versatile arsenal of aquaglyceroporins may help the mycoparasite extract particular molecules at the hyphae of a broad range of potential host prey. Some examples in an amplified spectrum of genes have also been found for virulence factors (chitinases, hydrophobins, etc) in certain BCAs, which seem correlated with their strong mycoparasitic abilities [37, 38]. With

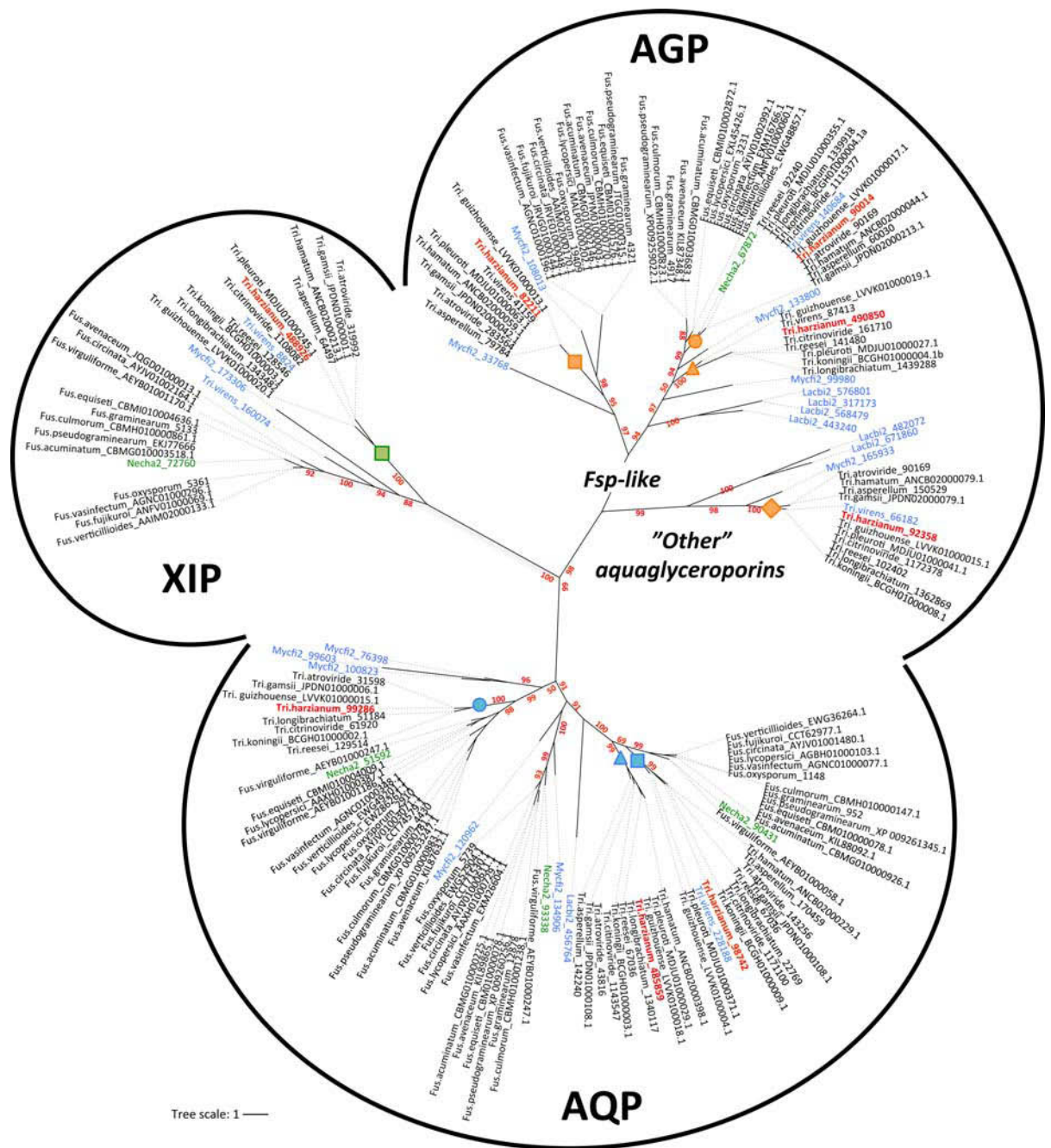


Fig 1. Unrooted phylogeny of MIP protein sequences from genera *Trichoderma* and *Fusarium* genus. AQP, classical aquaporins; AGP, aquaglyceroporins; XIP, X-intrinsic protein. The bootstrap values indicated at the nodes are based on 500 bootstrap replicates. Branch values lower than 50% are hidden. The distance scale denotes the evolutionary distance expressed in number of amino acid substitutions per site. MIP sequences from *T. harzianum* (CBS 226.95 v1.0 as reference, JGI) are highlighted in red. MIP sequences from *F. solani* (*Nehca2* for *Nectria haematococcae*, JGI) are highlighted in green. The reference sequences used to give the MIP sub-group nomenclatures are highlighted in blue (*Lacbi2*, *Laccaria bicolor* V2; *Myci2*, *Mycosphaerella fijiensis* V2; *Tri.virens*, *Trichoderma virens* V2; JGI). Accession numbers of proteins are attached after each species name; both are listed in [S1 Table](#). Protein sequences are given in [S1 Fig](#). Orange, blue and green squares, circles and triangles indicate nodes that include specific *T. harzianum* MIP members. This code refers to [Fig 2](#) and [S1 Table](#).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.g001>

the availability of the MIP gene sequences, this work lays a firm phylogenetic foundation from

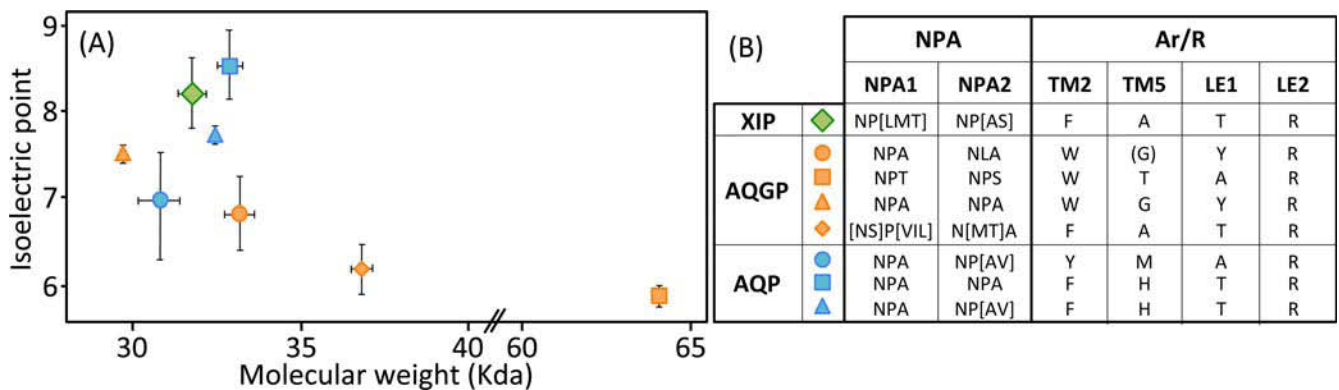


Fig 2. Biochemical features of *Trichoderma* MIP. (A) Relationship between isoelectric point and molecular weight for *Trichoderma* spp. MIP clusters. Plot showing isoelectric point versus molecular weight for XIP (X), aquaglyceroporins (X) and aquaporins (X). Subgroups are detailed in the phylogeny in Fig 1 and in the S1 Table. Means ± SE according to number of MIP members from each subgroup. (B) Amino acid diversity in NPA boxes and Aromatic/arginine selectivity filters in the different MIP subgroups from *Trichoderma* spp. Exact ar/R locations on MIP proteins are detailed in Figs 3A, 4A and 5A.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.g002>

which to investigate this possibility by means of respective knock-out strains, and to assess possible gene regulatory network resetting linked to MIP.

MIP structure

The MIP protein family in fungi contains a large number of highly divergent proteins. Apart from being assessed by their sequence identity, MIP diversity can be monitored not only through their biochemical features such as isoelectric points (pI) and molecular weights (MW), but also and most importantly, by modeling their three-dimensional profiles. (Fig 2; S1 Table). Except for the AQGP subgroup with Fps-like and "Other", MIP in *Trichoderma* spp. show a mean of 303 amino acids and a mean MW of 32 kDa. These features cover expected value ranges [39]. An analysis of their overall structure shows that most AQP are neutral or basic, the XIP are basic, and the majority of AQGP are neutral or acidic (Fig 2). Their distributions are in line with what has been observed for a broad range of MIP from other fungi [40].

However, this analysis may be too simplistic, as these distributions do not reveal subtle features, especially as regards to potential sites of regulation such as loops and specific residues or motifs inside the pore. Further molecular structure analysis by modeling shows that the central channel polarization seems conserved, with almost the same distribution of charges along the z-axis. The positive charge of the guanidinium group of the characteristic arginine in the constriction region is strongly expressed, and radiates over a long portion of the light of the pore (Figs 3B, 3C, 3D, 4B, 4C, 4D, 5B, 5C and 5D) in the absence of an immediate counterion. In fact, most of the differences in size and charge of the MIP mentioned here stem from the polymorphism of their amino and carboxy terminal extensions, whose role has not yet been completely characterized (Figs 3A, 4A and 5A). We focused our interest on the MIP that are constitutively expressed (*ie* Fsp-like-90014 Fig 3; "Other AQGP"-92358 members Fig 4; AQP-98742, Fig 5; XIP-488926, Fig 5; *cf* section "MIP expression"), and inspection of the alignments by phylogenetic group shows that, aside from those variable extensions at both ends, we are facing two groups of MIP in terms of their putative transport capabilities. On one hand, we have what resembles water -and by extension H₂O₂- facilitators in the case of the AQP-98742 member and the XIP-488926 member, and on the other hand, we have probable glycerol facilitators in the case of the "Other AQGP"-92358 member and the Fsp-like-90014 member, whose family is also known to group glycerol facilitators regulated by osmotic changes [16]. This segregation is

AQGP; Fsp-like-90014

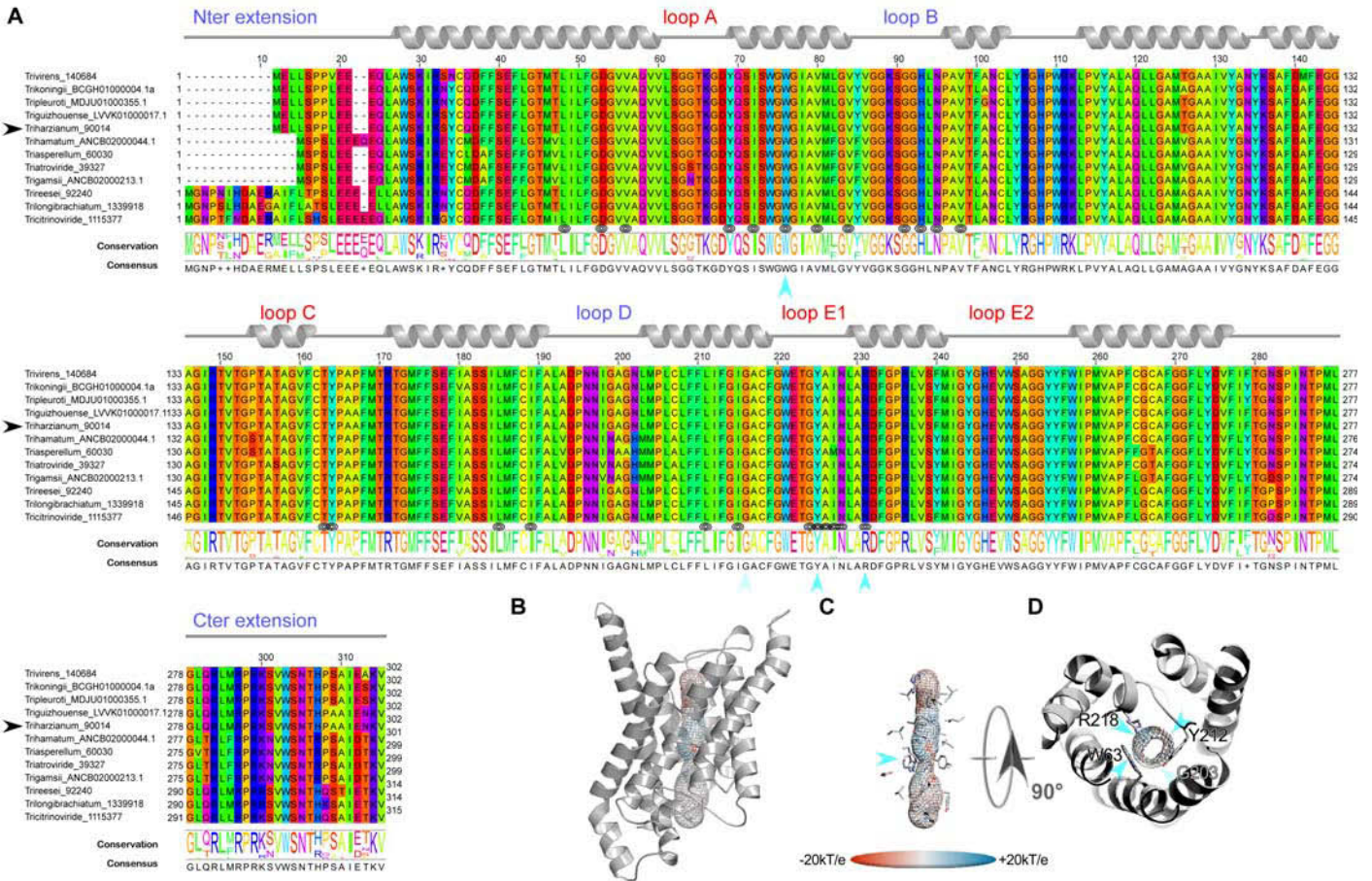


Fig 3. Structural analysis of the expressed fungal Fsp-like-90014 MIP. (A) Multiple sequence alignments (MSA) were generated from MIP homologs of different groups by group from various fungi computed with Muscle WS in Jalview, and colored by the Taylor color code. Homologous *T. harzianum* strains CBS 226.95 of the expressed members from *Ths97* are indicated by a black arrow before their names. Topology of each type is indicated by a ribbon diagram above the sequences on which the different segments are labeled in blue for those in the inner compartment, and red for the outer compartment. The positions of the residues exposed to the light of the channel are designated by a target symbol formed of three black circles under the MSA. The conservation and consensus sequence are given and marked by blue arrows to indicate the positions at the constriction site. (B) Models of an I-Tasser computation (after different runs to improve the confidence range) are shown in PyMOL scenes. The C-score (estimating the quality of the prediction) is positive for this model used (Cscore = 1.18), suggesting a good level of confidence in all the predictions (the normal range of C-scores being between -5 and 2). The pore established with "MOLE-2" is materialized by a grid on which the electrostatic potential calculated by APBS with the PARSE forcefield is reported to compare the physicochemical nature of the channels. (C) Focus on the residues of the pore. A blue arrow indicates the ar/R region. (D) Sidechains of the amino acids constricting the channel after both NPA motifs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.g003>

confirmed on a Newick tree when comparing the four models on multiple structural alignments with MulPBA [27]. This could be extended to the other members of each subfamily or group considered here because of their intra-proximity. The primary difference justifying this segregation is located at the principal constriction site in the central pore, the so-called ar/R filter, which is slightly smaller in the water-specific AQP and composed of four residues, and slightly larger in the aquaglyceroporin and composed of four residues of which one is small (alanine) or by only three residues (the fourth is absent, and instead a glycine is found in its position). In our case, the constriction site is composed of F65, H185, T194 and R200 for the AQP-98742 member, of N81, S211, Q225 and R230 for the XIP member, of F100, A244, T251 and R258 for the "other AQGP"-92358 member, and W63, Y212, and R218 for the Fsp-like-90014 member (Figs 2, 3A, 4A and 5A). The associated diameters measured at this site on our models with the MOLE 2.0 approach

AQGP; "Other" AQGP-92358

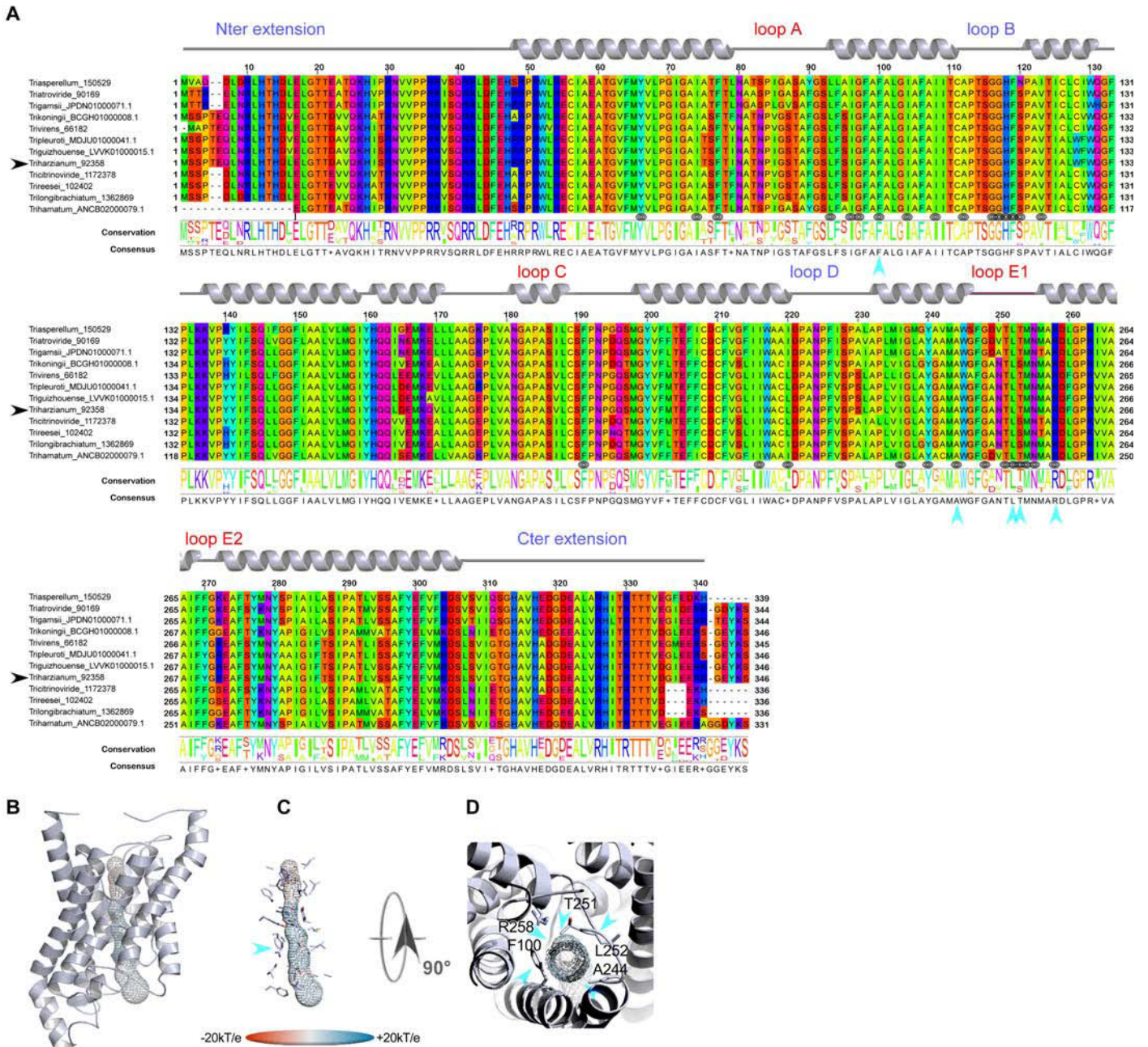


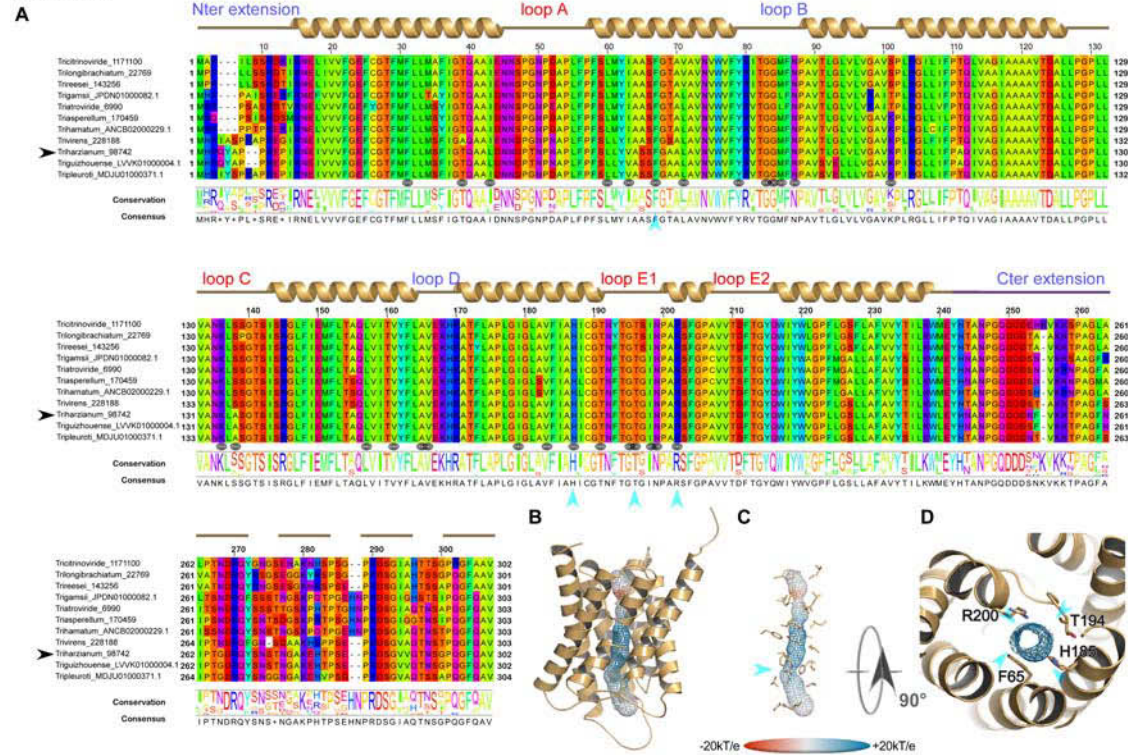
Fig 4. Structural analysis of the expressed fungal "other AQGP"-92358 MIP. (A) Multiple sequence alignments (B) Models out of an I-Tasser computation. The C-score (0.51) is positive, suggesting a good level of confidence in all the predictions. The pore is materialized by a grid on which the electrostatic potential is reported to compare the physicochemical nature of the channels. (C) Focus on the residues of the pore. A blue arrow indicates the ar/R region. (D) Sidechains of the amino acids constricting the channel after both NPA motifs. Technical procedures for each item are detailed in the Fig 3 caption.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.g004>

were 1.28Å, 1.8Å, 3.78Å and 2.54Å, respectively, which is consistent with the reasonable assumption that the aperture in the glycerol transporters will be larger than in strict water transporters.

The second difference arises from the extracellular loops (A, C and E), which present variable lengths. Loop A with 14 residues (D42-P55) is prominent as expected for the AQP-98742

AQP-98742



XIP-488926

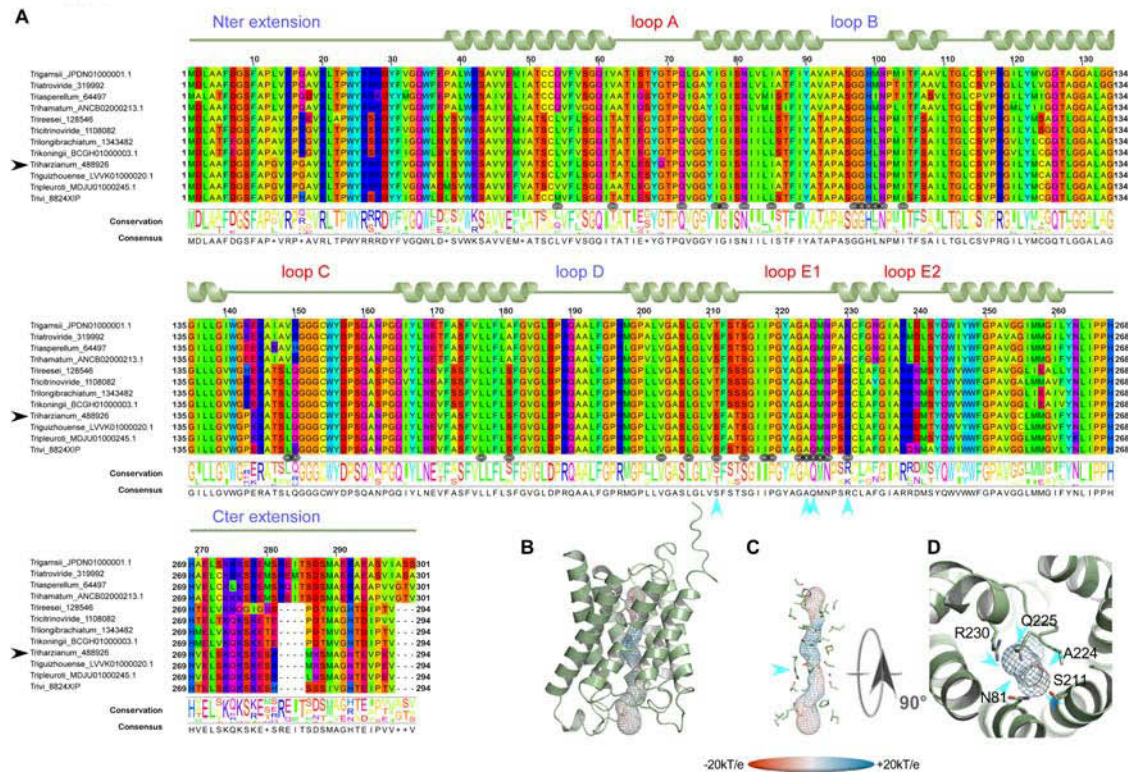


Fig 5. Structural analysis of the expressed fungal AQP-98742 and XIP-488926 MIPs. (A) Multiple sequence alignments (B) Models out of an I-Tasser computation. The C-score are positive for all two models used (Cscore = 1.39 for AQP-98742; Cscore = 1.26 for XIP-488926), suggesting a good level of confidence in all the predictions. The pore is materialized by a grid on which the electrostatic potential is reported to compare the physicochemical nature of the channels. (C) Focus on the residues of the pore. A blue arrow indicates the ar/R region. (D) Sidechains of the amino acids constricting the channel after both NPA motifs. Technical procedures for each item are detailed in the [Fig 3](#) caption.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.g005>

member. This is also found on the "other AQGP" member, where it measures 13 residues (N80-S92); loop A is found to be slightly shorter with 10 residues (L65-G74) for the XIP, and is substantially halved with 7 residues (S49-D55) for the Fsp-like-90014 member. This criterion does not seem to be discriminating in terms of molecules to be transported. Conversely and more remarkably, loops C and E seem to permit a distinction in the nature of the transport ensured by the MIP, suggesting a possible coupling with a third-party effector, as it could provide an interacting site for one. We note that both putative glycerol facilitators share a common topology concerning their long loop C, which fits the model of an alpha hairpin as found in the GlFp, for which the archetype namely the *E. coli* Glycerol Facilitator structure was released [41]. The second alpha helix of the hairpin is mostly hydrophobic and ends with a cysteine, which is also found in the XIP member at the same position near the pore entry. In both putative glycerol transporters, this segment is 20 residues longer than its homolog in the AQP-98742 fold: loop C is 19 residues long in the AQP member, 24 residues in the XIP member, 38 residues in the "other AQGP" member, and 36 residues in the Fsp-like-90014 member. On the intracellular side, we note a last subtle but still remarkable difference between the two GlFp candidates expressed concerning the net charge of loop B. In the first segment of this long loop, prior to the short NPA helix and at the very beginning of the loop, a lysine conserved in the Fsp-like subgroup (K76) is found instead of a conserved threonine (T114) as in the "other AQGP" members. *Post hoc*, the characteristic asparagine residue of the NPA motif is replaced by a serine in most of the "Other AQGP" members. In the second part of this loop, a conserved arginine (R93) is present in the Fsp-members, while this position is occupied by a glutamine (Q131) in most of the "other AQGP" members. This loop ends in both groups in a basic motif of two successive lysines in the "other AQGP" and an arginine followed by a lysine in the Fsp-members. To sum up, this loop is more basic in the Fsp candidates in addition to the presence of a supernumerary and conditional positive charge of a histidine (H95 instead of the neutral F133). This could have implications in how the two kinds of pores function, for example in their ability to interact with possible regulators, or in their ability to favor one circulating direction for the polyols they can tunnel across the membrane. The impact of such a subtle difference will need to be addressed in further investigations.

Even more interesting, in both GlFp-like proteins we found an internal salt bridge between the conserved aspartate next to the ar/R filter arginine with another arginine on the helical turn immediately following, possibly helping to regulate aperture size by tilting the short NPA helix (Fig 6). This also occurs in generic GlFp, where this hemihelix is also one turn longer than its homolog from the AQP-98742 member. This is currently apparent in two available structures, an aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* (pdb code 3C02) and the first in the series of the *E. coli* glycerol facilitator (pdb code 1FX8). It implies translocation of the arginine of the filter, and its Cbeta moves about 1 Å away from its canonical position on classical aquaporins. This *in silico* data can provide intuitive insight into the potential permeability properties of the channel in transporting not only polyhydroxyl alcohols (or polyols such as glycerol), but also more voluminous polyols such as erythritol, arabitol, sorbitol and mannitol as observed for pfAQP and ApAQP2, two multifunctional aquaglyceroporin channels from *Plasmodium falciparum* and *Acyrtosiphon pisum*, respectively [42, 43]. These polyol

conservation threshold of 50% is applied to highlight the conservation by groups. From this comparison emerges the particular meaning of the conserved GfP motif NPARD: the conserved negatively-charged residue aspartate makes a salt bridge with an equally conserved residue at exactly one α -turn from it. This bridge quenches both charges by mutual neutralization, allowing their presence in a quite hydrophobic environment for folding purposes (first quarter of α -6). (B) PyMOL scene of the superimposition results from mulPBA displayed as a wireframe diagram of the main chain colored with respect to the sequence name coloring. The channel is shown as a transparent volume to materialize the localization. The sidechain of the conserved arginine from the NPAR motif is shown as sticks, as also are both charged residues occurring only in the GfP proteins (light and dark red). A red arrow shows the relative displacement (concomitant with this type of electrostatic bridge within the short α -helix of loop E) responsible, at least in part, for a larger pore aperture at its constriction site. Only the NPA α -helices are shown as transparent colored coils (C) Summary of the superimposition score from mulPBA. (D) Structural alignment of MIP from the *T. harzianum* strain CBS 226.95 homologous to those expressed from *Ths97* and based on the coordinates of good quality I-Tasser homology models. The MSA is colored by the Taylor color code in Jalview. On the left, the Newick tree established by mulPBA is given showing the relative proximity of both XIP-488926 and AQP-98742 members on one side, and both "other AQGP"-92358 and Fsp-like 90014 members on the other side. Models are consistent with previous data obtained on experimental structures. A conservation threshold of 50% is also applied to highlight the conservation by groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.g006>

transporters, alongside specific sucrose transporters, could be expected to feed the fungal carbohydrate metabolism, which provides energy for hyphal growth and supplies carbon skeleton to other metabolisms. However, and again most importantly, they may participate in the continuous process of generating hydrostatic pressure used by the pathogenic hyphae to break the hyphae cell wall surface of its host and penetrate it. Because polyols make a major contribution to the osmotic ballast, water and polyols are two interplaying components essential for hyphae integrity when fungi move in fluctuating environments [42, 15, 16].

Finally, we used the Glycopred prediction method to examine the differences in terms of numbers of potential glycosylation sites in these external loops. All of them are potentially glycosylated except for loop A of the FSP member, loop C of the AQP and loop E of the XIP and both putative glycerol facilitators. Most of the sites are far from the central pore. In the putative glycerol facilitators, glycosylation sites are found in the descending hydrophobic helix of loop C.

To conclude, on the basis of these structural and possible functional considerations, elucidating the physiological role of MIP in *Trichoderma* spp. through in-depth functional studies with MIP variants in key residues will answer these important unanswered questions. However, this approach will not be applied on *Ths97*: systematic of *T. harzianum* appears to be complex with many cryptic species, making it quite difficult to work with. Mutagenesis technologies require double cross-over homologous recombination around 1,5kb up- and downstream of the target gene, and therefore a thorough knowledge of intergenic regions, which are highly diversified and complex between *T. harzianum* spp. in contrast to the transcribed regions, which are highly conserved as shown by MIP genes. Thus, our hypothesis will need to be confirmed in the future by mutagenesis of MIP from *Trichoderma* species whose genomes are sequenced.

MIP expression

The transcriptome of *Trichoderma* is still the subject of several molecular studies, leading to the identification of pathways involved in the different aspects of biocontrol mechanisms [1, 44, 45, 46]. From these studies, however, no MIP information has yet been provided. To complete the *in silico* identification of candidates for MIP channels, their expression profile was addressed at transcript level using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) with MIP gene-specific primers. Molecular analysis is aimed primarily at *Trichoderma* under non-mycoparasitic conditions (mycelial growth or infestation without its host *F. solani*, corresponding to the control samples) or under mycoparasitic conditions in the presence of *F. solani* (corresponding to the assays). Additionally, two different biological contexts were studied: on "artificial substrates" with PDA on Petri dishes (*in vitro*), and in roots from young olive trees (*in planta*). Similarly, MIP expressions from *F. solani* were studied in the same biological conditions. Results demonstrated that of the eight MIP genes

present in the genome of *T. harzianum*, only four were transcribed with significant differential modulation during mycelial growth on an artificial medium and on olive roots (Fig 7). In detail, the steady-state level of transcript abundance of AQP-98742, AQGP-92358 and XIP-488926 was higher during the mycelial growth *in planta* than *in vitro*, while AQGP-90014 was slightly less abundant. These diverging expressions between “growth environments” are not surprising and have already been mentioned [47]. They could result from the presence of various chemical factors in plant tissues that may be lacking in artificial substrates. Similarly, these contrasting expressions could be linked to a subtle difference observed between the net charges of their respective loop B that would determine a specific ability to favor one circulating direction of particular solutes across the membrane.

Concerning the confrontation situations, and irrespective of the biological contexts (*i.e.* preventive or curative), the expressions of these four MIP were significantly modulated by the presence of *F. solani*. It is of note that the onset of a differential expression of MIP genes is a rather early event during the interaction with host prey: it occurs during the first stage of mycelial growth, when *T. harzianum* is in physical contact with its prey. MIP transcript abundance then increased considerably over the contact area between *T. harzianum* and *F. solani*.

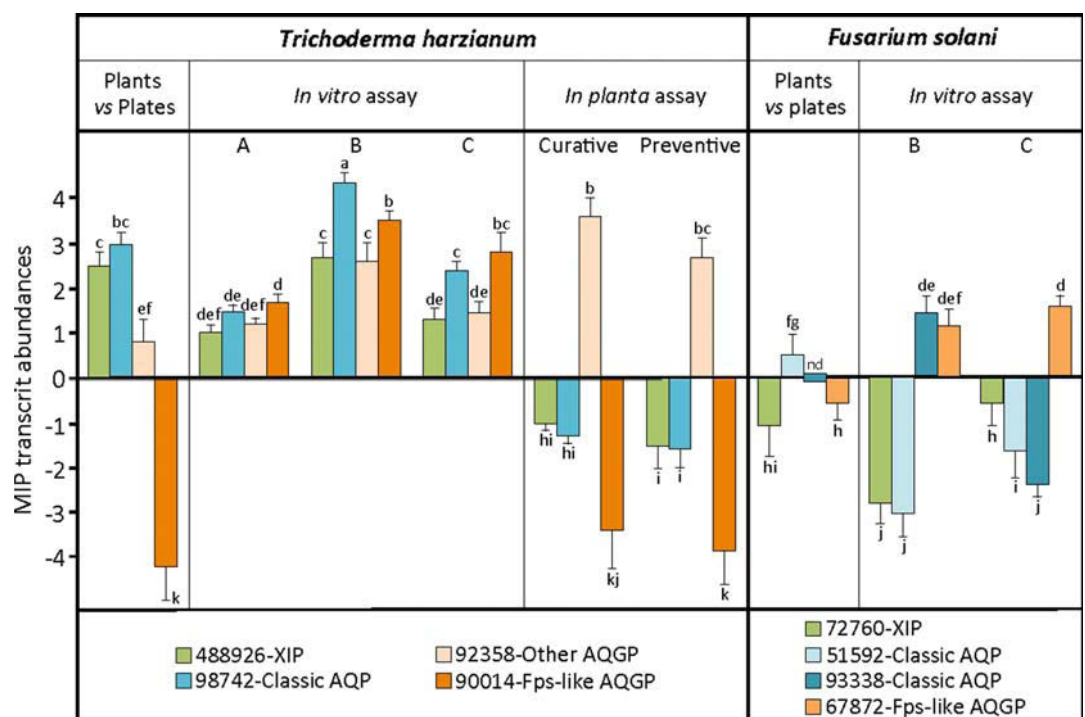


Fig 7. Relative transcription ratios of the MIP genes from *T. harzianum* and *F. solani*. Relative expression levels of MIP genes from *T. harzianum* (*Ths97*) and *F. solani* (*Fso14*) cultivated separately or together in artificial culture (after 6 days of inoculation) or on roots of olive trees (after 8 weeks of inoculation). **Plants vs Plates:** constitutive steady state level of MIP expression from *T. harzianum* and *F. solani* cultivated separately in plants or on PDA medium. **In vitro assay:** (A) *T. harzianum* individually, (B) area of confrontation between hyphae, (C) area of overlap of *T. harzianum* on *F. solani* (detailed in S2 Fig). **In planta assay:** inoculated separately in roots or in curative and preventive contexts (root symptoms detailed in S3 Fig). Transcript levels for each gene were estimated using real-time qRT-PCR analyses, and normalized by the expression of three housekeeping genes specific for each fungal strain. Relative transcript abundance rates were obtained by the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ method with transcript abundances from individual *in vitro* culture or *in planta* inoculation. Data correspond to means of three independent biological experiments. Bars represent the biological standard error. Data not sharing the same letter are significantly different (Tukey *post-hoc* test after one-way analysis of variance (ANOVA), $p < 0.05$). Nd, transcript non-detectable significantly.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.g007>

Unexpectedly, MIP patterns contrasted sharply between the artificial and *in planta* dual culture contexts, except for AQGP-92358, which remained up-regulated. AQP-98742, AQGP-90014 and XIP-488926 were up-regulated in artificial substrates, but down-regulated *in planta*. Very few functional studies have been carried out on fungal MIP. However, AQP-98742 belongs to a MIP cluster that comprises MIP with putative water channels [12, 14, 47]. AQGP-90014 belongs to a "facultative Fsp-like aquaglyceroporin" cluster including MIP with putative water, glycerol and small neutral molecule transport channels [13, 17, 48], whereas AQGP-92358 belongs to the "other-aquaglyceroporin" cluster made up of MIP that present glycerol and small neutral molecule transport capacities [13, 15]. Concerning XIP, no biochemical validation has been reported in fungi. However, three inputs can be exploited to gain a better understanding of this unorthodox cluster: (i) the MIP JQ412059 from *Glomus intraradices*, a relatively proximate phylogenetic homolog of fungal XIP [16], exhibits a water transport channel [49], (ii) its transcriptional kinetics parallel that of AQP-98742 (Fig 7), and (iii) three-dimensional structure analysis suggests a tighter channel, particularly at the constriction zone approaching the level seen in the AQP-98742 channel (Fig 5). This would indicate a plausible ability to channel water and possibly other small polar molecules like H₂O₂, but not glycerol as previously observed for certain XIP from plants [50, 51, 52]. Despite these putative biochemical extrapolations, and because evidence of how MIP take part in fungal lifestyles is still scant and speculative, further interpretations concerning the putative involvement of each member during mycoparasitism of *Ths97* would be premature. However, data do suggest that *F. solani* has a direct influence on *Ths97* genome reprogramming, and this is significant when we read the MIP expression from the '*in planta*' biological context. This takes place invariantly whether *Ths97* has colonized healthy plant tissues prior to a *F. solani* infestation (preventive treatment) or an infested fusarium environment (curative treatment). The *in vitro* and *in planta* environments are not comparable, and it is difficult to envisage how *F. solani* can directly up- or down-regulate some *Ths97* genes in specific environments, unless we consider the possibility that *Ths97* displays a direct mycoparasitic activity on *F. solani*. The interaction of *T. harzianum* with *F. solani* is described as mycoparasitic [35], and this feature was observed *in vitro* between *Ths97* and *Fso14* (S2 and S3 Figs) [2]. This overall adjustment may be supplemented by the release of cell-wall-degrading enzymes, known to be directly involved in the mycoparasitism interaction, and whose production is influenced by various ambient factors [53, 54, 55]. These fine and complex molecular adjustments generate specific metabolized-products (*i.e.* oligomers) that may themselves become secondary inducers of cell responses for *Trichoderma* [56, 57]. This would explain the differential expression patterns of transcripts encoding MIP proteins observed during the different biological contexts and stages of confrontation.

Two other interesting scenarios should be considered. The first one is that the biochemical environments of the intercellular space change fundamentally. This event is mainly due to the virulent activity of *F. solani* and also its ability to secrete an arsenal of hydrolytic enzymes [58, 59]. Certain particular plant residues generated by *F. solani* could interfere here with *Ths97* cellular responses. Such residues are inevitably absent in the *in vitro* context, but could possibly be produced when *F. solani* infests its plant host. In the second scenario, although no information is available about competition and defense reactions of *F. solani* as a host, *F. solani* would be able to develop a differential toxicogenic activity *in planta* compared with the *in vitro* context (like *Ths97*, *F. solani* senses and responds differentially to contrasting environments) [60, 61], and specific secreted mycotoxins (possibly in a "growth medium"-dependent manner) could affect certain gene responses in *Ths97* without, however, upsetting its mycoparasitic behavior. To the best of our knowledge, there is no evidence to support these two last suppositions, but whatever the case, the transport machinery reprogramming for *Ths97* is governed by environmental changes, probably due to the presence of exudates released from the host mycelium (*F.*

solani), whose priority remains to meet nutritional needs. As for *F. solani* MIP expression patterns, four MIP out of the six in its genome were transcribed and differentially modulated. Interestingly, none of them was significantly detectable in infested plants treated with *Ths97*. This result provides new evidence suggesting the ability of the beneficial partner to drastically reduce the population of its host target.

MIP regulation

In line with previous findings, we showed here that *Ths97* seems able to sense the presence of its host prey and respond by modulating a set of genes that could be involved in its mycoparasitism. In our work on MIP, we are aware that correlations alone do not allow a causal link to be established. In addition, the transcriptional level does not represent what happens at the protein level. However, there are good indications that MIP transcript regulations may imply assigned functions of isoforms in mycelia trans-cellular solute flows. Thus whatever the biological contexts, we can intuitively expect the expression of a broad range of genes to depend preponderantly on solute sources (carbon, nitrogen, minerals, etc) available in the environment. One of the major challenges facing biologists is to unravel the complex networks that govern these gene expressions. One clue could come from the establishment of the existence of metabolons. Transcriptional regulation relies to a large extent on molecular mechanisms that allow nucleic acid binding proteins or transcription factors (TF) to recognize specific sets of nucleic acids in DNA, known as transcription factor binding sites (TFBSs) or *cis*-regulatory sequences. Identifying these regulatory elements in non-coding regions is an interesting key step in understanding gene regulation and ultimately in inferring regulatory networks.

We scanned 1.5kb upstream of the start codon of the four expressed MIP using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* dedicated promoter database SCPD [32]. Conscious of the limitations inherent in such a systematic analysis on TFBSs, which are usually very short and statistically often highly degenerate, the fact remains that results showed an over-representation of motifs targeted by TFs known to be involved in various carbon, nitrogen sulfur and phosphate metabolic processes (Tables 1 and S3). Between 62% and 81% of motifs constituting the four MIP promoters are in promoters of genes encoding proteins involved in carbohydrate, fatty acid and sterol, amino acid or nucleotide metabolisms. Unexpectedly, motifs involved in the cellular responses to stress (osmosensing and ion homeostasis pathways, drug metabolism and exportation, oxidative stress) were poorly represented (<0.05%). This contrasts notably with plant MIP promoters, which contain a large number of TFBSs related to cellular responses to abiotic and biotic stress [62, 63, 64]. The remaining motifs control mRNA transcription, cell growth and division, and DNA synthesis (meiosis process) (S3 Table). We hypothesize that this *cis*-element provides indications about the potential involvement of these MIP in establishing a trophic relationship that *Trichoderma* creates with its surroundings, and especially here with *F. solani*, with which *Ths97* initiates a competitive relationship. This functional trend corroborates previous findings where functional annotations of different wide-transcript libraries linked to a mycoparasitic context indicated a substantial over-represented category related to various metabolic processes [35, 53, 55, 65]. Finally, if *F. solani* really influences *Ths97* genes expression in some way, then it would be relevant to identify the TFs network from *Ths97*, which could be in direct relation with certain virulence effectors secreted by *F. solani* during its plant tissue infestation phase, or related metabolized products in the case of effectors with intrinsic hydrolase activities. To further test our hypothesis of a plausible involvement of MIP in the competition machinery of *Trichoderma* against various pathogens, and the establishment of its trophic network, suppression of MIP gene function within non-coding and encoding regions would have to be addressed in future experiments.

Table 1. Proportion of putative transcription factor binding sites (TFBSs) on the 1.5kb promoter region of the expressed MIP genes from *Trichoderma harzianum*. MIP promoter sequences from *T. harzianum* CBS 226.95 v1.0 (JGI) were used as reference. TFBSs were detected with the "Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*" (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>), and biological processes (GO) analyzed using «Uniprot» (<http://www.uniprot.org/>). TFBS nucleotide sites on 1.5kb of each promoter are detailed in the S3 Table.

Cis-motif	UniProt identifier	XIP 488926	AQP 98742	AQGP 92358	AQGP 90014	
ADR1	P07248	4 (3,8%)	2 (1,8%)	4 (3,3%)	4 (3,6%)	Carbon and nitrogen metabolic processes
BAS2	P07269	1 (0,9%)	7 (6,1%)	1 (0,8%)	0	
CSRE	-	1 (0,9%)	1 (0,9%)	1 (0,8%)	0	
GAL4	P04386	2 (1,9%)	0	0	0	
GCN4	P03069	20 (14,4%)	12 (10,5%)	16 (13%)	9 (8,1%)	
GCR1	P07261	9 (8,7%)	12 (10,5%)	18 (14,6%)	21 (18,9%)	
LEU3	P08638	1 (0,9%)	1 (0,9%)	0	0	
MCM1	P11746	1 (0,9%)	2 (1,8%)	2 (1,6%)	2 (1,8%)	
MIG1	P27705	1 (0,9%)	1 (0,9%)	6 (4,9%)	3 (2,7%)	
PUT3	P25502	4 (3,8%)	0	0	0	
CAR1 Repressor	P39001	15 (14,4%)	12 (10,5%)	19 (15,4%)	13 (11,7%)	
RAP1	P11938	2 (1,9%)	1 (0,9%)	1 (0,8%)	0	
STE12	Q03063	4 (3,8%)	4 (3,5%)	6 (4,9%)	8 (7,2%)	
PHO2	P07269	12 (11,9%)	12 (10,5%)	13 (10,6%)	8 (7,2%)	Phosphate transport and metabolic processes
PHO4	P07270	4 (3,8%)	4 (3,5%)	13 (10,6%)	4 (3,6%)	
		81/104 (77%)	71/114 (62%)	100/123 (81%)	73/114 (64%)	
PDR1-PDR3	P33302	0	0	5 (4,1%)	0	Cellular cation homeostasis / xenobiotic transport
ROX1	P25042	2 (1,9%)	1 (0,9%)	0	1 (0,9%)	Cellular response to osmotic stress
RML1	Q12224	0	1 (0,9%)	0	0	Cellular response to stress
SMP1	P38128	1 (0,9%)	1 (0,9%)	0	0	Cellular response to stress
XBP1	P39001	1 (0,9%)	1 (0,9%)	1 (0,8%)	3 (2,7%)	Cellular response to oxidative stress
		4/104 (0,04%)	4/107 (0,04%)	6/123 (0,05%)	4/114 (0,04%)	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193760.t001>

Conclusion

Our present results bring us nearer to understanding one molecular mechanism potentially involved in the mycoparasitic process of *T. harzianum* (with the example of *Ths97* here) with the involvement of the MIP family. Modulated transcript abundance of members belonging to the three sub-classes representative of the fungal MIP family suggests the importance of transporting certain specific solutes during hyphae development and possibly self-defenses. However, owing to the complexity of the underlying mycoparasitism mechanisms, an in-depth understanding of the functional characterization of the MIP genes reported here is essential, and this will be improved by future studies of their subcellular localization, post-translational regulation and precise roles in signaling and solute transporting processes in such "myco-phytoparasitic" tripartite interactions. Part of this effort will require focusing on key residues shown in this study to be responsible for the specialization of the two GlFp and subsequently testing these by mutagenesis approaches. Lastly, if we consider -by definition- that MIP are virulent factors in this (myco)parasitic interaction, the manipulation of candidate MIP genes linked to virulence activity remains a pertinent approach to improve the *T. harzianum* strain.

Supporting information

S1 Fig. Detail of all MIP protein sequences used in this work.

(PDF)

S2 Fig. Symptoms of fusarium root rot disease on root system from olive trees. Preventive treatment: *Ths97*-treated plants subject to *Fso14* infestation; Curative treatment: *Fso14* infested plants treated with *Ths97*. Dual inoculation contexts were set up with a 10-day delay between each fungal inoculation. Fungi were inoculated on roots.

(PDF)

S3 Fig. Culture of *F. solani* (*Fso14* strain) and *T. harzianum* (*Ths97* strain) cultivated separately, or together in a dual growth context related to a mycoparasitic situation. Mycelial were grown in Petri dishes on PDA medium. Slides show 6 days of growth at 27°C. Letters A, B, and C on dual culture assay correspond to area sampled for molecular experiments, with (A) *Ths97* individually, (B) area of confrontation between mycelia, and (C) area of overlap of *Ths97* on *Fso14*.

(PDF)

S1 Table. Features of the non-redundant representative fungal MIP proteins from *Trichoderma* and *Fusarium* species used in the phylogenetic analysis. Reference species for MIP nomenclature: *Mycosphaerella fijiensis* (Mycfi) and *Laccaria bicolor* (Lacbi). AQP, aquaporins; AQGP, aquaglyceroporins; XIP, X-intrinsic proteins.

(PDF)

S2 Table. Primers used for qPCR amplification.

(PDF)

S3 Table. Detail of the TFBS nucleotide sites found on 1.5kb of each promoter of the four expressed MIP.

(PDF)

Acknowledgments

The authors wish to thank the Institut de l'Olivier (Department of "Amélioration et Protection des Ressources Génétiques de l'Olivier", University of Sfax, Tunisia) for the two strains of fungi used in this study and for carrying out all the experiments on olive trees. We are grateful to Céline Sac and Dominique Marcon for their technical assistance in molecular biology and photographic editing, respectively. This work was supported by the PHC program "Uthic" from Campus France (grant 34861PF) under the joint aegis of the Tunisian Ministry of Foreign Affairs and the French Ministry of Higher Education and Scientific Research. The authors also wish to acknowledge Christie Nielsen Chaar for generously providing the final linguistic revision of the manuscript. We are also grateful to the anonymous reviewers for their constructive comments.

Author Contributions

Conceptualization: Daniel Auguin, Jean-Stéphane Venisse.

Data curation: Jean-Stéphane Venisse.

Formal analysis: Jean-Stéphane Venisse.

Funding acquisition: Jean-Stéphane Venisse.

Methodology: Maroua Ben Amira, Robin Mom, David Lopez, Hatem Chaar, Daniel Auguin, Jean-Stéphane Venisse.

Project administration: Hatem Chaar, Ali Khouaja, Valérie Pujade-Renaud, Philippe Label, Jean-Louis Julien, Mohamed Ali Triki, Jean-Stéphane Venisse.

Resources: Philippe Label, Daniel Auguin, Jean-Stéphane Venisse.

Software: Robin Mom, Boris Fumanal, Gisèle Bronner, Daniel Auguin, Jean-Stéphane Venisse.

Supervision: Daniel Auguin, Jean-Stéphane Venisse.

Validation: Aurélie Gousset-Dupont, Daniel Auguin, Jean-Stéphane Venisse.

Visualization: Boris Fumanal.

Writing – original draft: Maroua Ben Amira, Robin Mom.

Writing – review & editing: Hatem Chaar, Boris Fumanal, Aurélie Gousset-Dupont, Gisèle Bronner, Philippe Label, Daniel Auguin, Jean-Stéphane Venisse.

References

1. Srivastava M, Pandey S, Shahid M, Kumar V, Singh A, Trivedi S, et al. Trichoderma: A magical weapon against soil borne pathogens. *African Journal of Agricultural Research* 2015; 10: 4591–4598.
2. Ben Amira M, Lopez D, Triki MA, Khouaja A, Chaar H, Fumanal B, et al. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control* 2017; 110: 70–78.
3. Waghunde RR, Shelake RM, Sabalpara AN (2016) *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *Afr J Agric Res.* 2016; 11: 1952–1965.
4. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637> PMID: 21921934
5. Finn RN, Cerda J. Evolution and Functional Diversity of Aquaporins. *Biol. Bull.* 2015; 229: 6–23. <https://doi.org/10.1086/BBLv229n1p6> PMID: 26338866
6. Madeira A, Moura TF, Soveral G. Aquaglyceroporins: implications in adipose biology and obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72: 759–771. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1773-2> PMID: 25359234
7. Wree D, Wu B, Zeuthen T, Beitz E. Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J.* 2011; 278: 740–748. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07993.x> PMID: 21205205
8. Wu B, Steinbronn C, Alsterfjord M, Zeuthen T, Beitz E. Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J.* 2009; 28: 2188–2194. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.182> PMID: 19574955
9. Almasalmeh A, Krenc D, Wu B, Beitz E. Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *FEBS J.* 2014; 281: 647–656. <https://doi.org/10.1111/febs.12653> PMID: 24286224
10. Angel A, Stahlberg H. Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions, and variable surfaces. *Int Rev Cytol* 2002; 215: 75–104. PMID: 11952238
11. Abascal F, Irisarri I, Zardoya R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 1468–481. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.001> PMID: 24355433
12. Pettersson N, Filipsson C, Becit E, Brive L, Hohmann S. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol. Cell* 2005; 97: 487–500. <https://doi.org/10.1042/BC20040144> PMID: 15966864
13. Soveral G, Prista C, Moura TF, Loureiro-Dias MC. Yeast water channels: an overview of orthodox aquaporins. *Biol Cell* 2010; 103: 35–54. <https://doi.org/10.1042/BC20100102> PMID: 21143194
14. Gupta AB, Sankararamkrishnan R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol.* 2009; 9: 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-134> PMID: 19930558
15. Dietz S, von Bülow J, Beitz E, Nehls U. The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. *New Phytol.* 2011; 190: 927–940. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03651.x> PMID: 21352231

16. Xu H, Cooke JEK, Zwiazek JJ. Phylogenetic analysis of fungal aquaporins provide insight into their possible role in water transport of mycorrhizal associations. *Botany* 2013; 91: 495–504.
17. Li T, Hu YJ, Hao ZP, Li H, Chen BD. Aquaporin genes GintAQPF1 and GintAQPF2 from *Glomus intradices* contribute to plant drought tolerance. *Plant Signal Behav* 2013; 8: e24030. <https://doi.org/10.4161/psb.24030> PMID: 23435173
18. Nehls U, Dietz S. Fungal aquaporins: cellular functions and ecophysiological perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 8835–8851. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6049-0> PMID: 25213914
19. Triki MA, Priou S. L'utilisation des traitements chimiques et biologiques pour réduire le risque de fuite de la pomme de terre causée par *Pythium aphanidermatum* en Tunisie. *Potato Res.* 1997; 40: 391–398.
20. Triki MA, Rhouma A, Khbou W, Boulila M, loos R. Recrudescence du dépérissement de l'olivier causé par les champignons telluriques en Tunisie. *Proceeding International Conference of Olive tree and Olive Products, Olive bioteq, Sfax, Tunisia*; 2009. pp. 142–147.
21. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40> PMID: 18215316
22. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 2010; 5: 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5> PMID: 20360767
23. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 2015; 12: 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213> PMID: 25549265
24. Tang CL, Alexov E, Pyle AM, Honig B. Calculation of pKas in RNA: on the structural origins and functional roles of protonated nucleotides. *Journal of Molecular Biology* 2007; 366: 1475–1496. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.001> PMID: 17223134
25. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10037–10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398> PMID: 11517324
26. DeLano WL. *PyMOL User's Guide*. DeLano Scientific, San Carlos, California; 2004
27. Léonard S, Joseph AP, Srinivasan N, Gelly JC, de Brevern AG. MulPBA: an efficient multiple protein structure alignment method based on a structural alphabet. *J Biomol Struct Dyn.* 2014; 32: 661–668. <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.787026> PMID: 23659291
28. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340> PMID: 15034147
29. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 2000; 17: 540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334> PMID: 10742046
30. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 2010; 59: 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010> PMID: 20525638
31. Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Chisten R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics.* 2006; 10: 439.
32. Zhu J, Zhang MQ. SCPD: A promoter database of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics* 1999; 15: 607–611. PMID: 10487868
33. Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Report* 1993; 11: 113–116.
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: 11846609
35. Vieira PM, Siqueira Guedes Coelho A, Steindorff SA, Linhares de Siqueira SJ, do Nascimento Silva R, Ulhoa CJ. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. *BMC Genomics* 2013; 14: 177. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-177> PMID: 23497274
36. Seidl V, Song L, Lindquist E, Gruber S, Koptchinskiy A, Zeilinger S, et al. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* 2009; 10: 567. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-567> PMID: 19948043
37. Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP. Complete survey of *Trichoderma* reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *The FEBS J.* 2005; 272: 5923–5939. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04994.x> PMID: 16279955

38. Kubicek CP, Baker S, Gamauf C, Kenerley CM, Druzhinina IS. Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. *BMC Evol Biol*. 2008; 8: 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-4> PMID: 18186925
39. Gomes D, Agasse A, Thiebaud P, Delrot S, Geros H, Chaumont F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 6: 1213–1228.
40. Verma RK, Prabh ND, Sankararamkrishnan R. New subfamilies of major intrinsic proteins in fungi suggest novel transport properties in fungal channels: implications for the host-fungal interactions. *BMC Evolutionary Biology* 2014; 14: 173. <https://doi.org/10.1186/s12862-014-0173-4> PMID: 25112373
41. Fu D, Libson A, Miercke LJW, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, et al. Structure of a glycerol conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*. 2000; 290: 481–486. PMID: 11039922
42. Beitz E, Pavlovic-Djuranovic S, Yasui M, Agre P, Schultz JE. Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 1153–1158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307295101> PMID: 14734807
43. Wallace IS, Shakesby AJ, Hwang JH, Choi WG, Martinkovaa N, Douglas AE, et al. *Acyrtosiphon pisum* AQP2: A multifunctional insect aquaglyceroporin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1818: 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2011.11.032> PMID: 22166843
44. Yao L, Yang Q, Song J, Tan C, Guo C, Wang L, et al. Cloning, annotation and expression analysis of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma harzianum* 88. *J Microbiol*. 2013; 51: 174–82. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2545-7> PMID: 23625217
45. Steindorff AS, Ramada MH, Coelho AS, Miller RN, Pappa GJ, Ulhoa CJ, et al. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics* 2014; 15: 204. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-204> PMID: 24635846
46. Zhang X, Harvey PR, Stummer BE, Warren RA, Zhang G, Guo K, et al. Antibiosis functions during interactions of *Trichoderma afroharzianum* and *Trichoderma gamsii* with plant pathogenic *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Funct Integr Genomics*. 2015; 15: 599–610. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0456-x> PMID: 26231513
47. Annis SL, Goodwin PH. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol*. 1997; 103: 1–14.
48. Navarro-Ródenas A, Ruíz-Lozano JM, Kaldenhoff R, Morte A. The aquaporin *TcAQP1* of the desert truffle *T. claveryi* is a membrane pore for water and CO₂ transport. *Molec. Plant-Microbe Interact*. 2012; 25: 259–266.
49. Li T, Hu YJ, Hao ZP, Li H, Wang YS, Chen BD. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol*. 2013; 197: 617–630 <https://doi.org/10.1111/nph.12011> PMID: 23157494
50. Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F. *Solanaceae* XIP are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *The Plant Journal* 2011; 66: 306–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04496.x> PMID: 21241387
51. Noronha H, Araújo D, Conde C, Martins A.P, Soveral G, Chaumont F, et al. The grapevine uncharacterized intrinsic protein 1 (VvXIP1) is regulated by drought stress and transports glycerol, hydrogen peroxide, heavy metals but not water. *PLoS ONE* 2016; 11: e0160976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160976> PMID: 27504956
52. Lopez D, Bronner G, Brunel N, Auguin D, Bourgerie S, Brignolas F, et al. Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *Journal of Experimental Botany* 2012; 63: 2217–2230. <https://doi.org/10.1093/jxb/err404> PMID: 22223812
53. Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* 2010; 48: 395–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114314> PMID: 20455700
54. Samolski I, de Luis A, Vizcano JA, Monte E, Suarez MB. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiology* 2009; 9: 217. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-217> PMID: 19825185
55. Sharma P, Vignesh KP, Ramesh R, Saravanan K, Deep S, Sharma M, et al. Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review. *African J Biotech* 2011; 10: 19898–19907.
56. Marcello CM, Steindorff AS, Silva SP, Silva RN, Bataus LAM, Ulhoa CJ. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiol. Res*. 2010; 165: 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.002> PMID: 18804353

57. Steindorff AS, Silva RN, Coelho ASG, Noronha EF, Ulhoa CJ. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *F. solani*. *Biol Control* 2012; 61:134–140
58. Kunitake E, Kobayashi T. Conservation and diversity of the regulators of cellulolytic enzyme genes in Ascomycete fungi. *Curr Genet*. 2017; 63: 951–958. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0695-6> PMID: [28451846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28451846/)
59. Glass NL, Schmoll M, Cate JH, Coradetti S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annu. Rev. Microbiol*. 2013; 67: 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044> PMID: [23808333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23808333/)
60. Idnurm A, Howlett BJ. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol* 2001; 2: 241–255. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00070.x> PMID: [20573012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20573012/)
61. Górna K, Perlikowski D, Kosmala A, Stępień L. Host extracts induce changes in the proteome of plant pathogen *Fusarium proliferatum*. *Fungal Biol*. 2017; 121: 676–688. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.04.008> PMID: [28705396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28705396/)
62. Yamada S, Bohnert HJ. Expression of the PIP aquaporin promoter-MipA from the common ice plant in tobacco. *Plant Cell Physiol*. 2000; 41: 719–725. PMID: [10945341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10945341/)
63. Li Y, Wu Z, Ma N, Gao J. Regulation of the rose Rh-PIP2;1 promoter by hormones and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*. 2009; 28: 185–196. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0629-3> PMID: [18985353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18985353/)
64. Lopez D, Venisse JS, Fumanal B, Chaumont F, Guillot E, Daniels MJ, et al. Aquaporins and Leaf Hydraulics: Poplar Sheds New Light *Plant Cell Physiol*. 2013; 54: 1963–1975. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct135> PMID: [24058149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058149/)
65. Tian C, Kasuga T, Sachs MS, Glass NL. Transcriptional profiling of cross pathway control in *Neurospora crassa* and comparative analysis of the Gcn4 and CPC1 regulons. *Eukaryot Cell* 2007; 6: 1018–1029. <https://doi.org/10.1128/EC.00078-07> PMID: [17449655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17449655/)

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

Complete Figure 4 legend:

Figure 4. Structural alignments of MIP to highlight noticeable differences in glycerol facilitators versus standard AQP. (A) Structural alignment of different MIP based on the coordinates of resolved structures made with MulPBA on a narrow but still representative sample of MIP of different classes from different kingdoms. The name of the proteins and their relative pdb code is written with distinctive colors on the left of the alignment, itself colored by the Taylor color code in Jalview. A conservation threshold of 50% is applied to highlight the conservation by groups. From this comparison emerges the particular meaning of the conserved GIFp motif NPAR: the conserved negatively-charged residue aspartate makes a salt bridge with an equally conserved residue at exactly one α -turn from it. This bridge quenches both charges by mutual neutralization, allowing their presence in a quite hydrophobic environment for folding purposes (first quarter of α -6). (B) PyMOL scene of the superimposition results from mulPBA displayed as a wireframe diagram of the main chain colored with respect to the sequence name coloring. The channel is shown as a transparent volume to materialize the localization. The sidechain of the conserved arginine from the NPAR motif is shown as sticks, as also are both charged residues occurring only in the GIFp proteins (light and dark red). A red arrow shows the relative displacement (concomitant with this type of electrostatic bridge within the short α -helix of loop E) responsible, at least in part, for a larger pore aperture at its constriction site. Only the NPA α -helices are shown as transparent colored coils (C) Summary of the superimposition score from mulPBA. (D) Structural alignment of MIP from the *T. harzianum* strain CBS 226.95 homologous to those expressed from *Ths97* and based on the coordinates of good quality I-Tasser homology models. The MSA is colored by the Taylor color code in Jalview. On the left, the Newick tree established by mulPBA is given showing the relative proximity of both XIP-488926 and AQP-98742 members on one side, and both "other AQGP"-92358 and Fsp-like 90014 members on the other side. Models are consistent with previous data obtained on experimental structures. A conservation threshold of 50% is also applied to highlight the conservation by groups.

Supplemental Table S1 Features of the non-redundant representative fungal MIP proteins from *Trichoderma* and *Fusarium* species used in the phylogenetic analysis. Reference species for MIP nomenclature: *Mycosphaerella fijiensis* (Mycfi) and *Laccaria bicolor* (Lacbi). AQP, aquaporins; AQGP, aquaglyceroporins; XIP, X-intrinsic proteins.

Supplemental Table S2 Primers used for qPCR amplification.

Supplemental Table S3 Detail of the TFBS nucleotide sites found on 1.5kb of each promoter of the four expressed MIP.

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

Faits Marquants et discussion sur ces derniers résultats

Il s'avère que *Ths97* agit comme un agent hyperparasite envers *Fso14*. Par définition, la relation établie avec son champignon hôte s'inscrit dans un contexte nutritionnel direct (Gagné, 1984). Comme expliqué dans la partie bibliographique et en préambule au chapitre 4, les transporteurs transmembranaires appartenant à la superfamille des MIP chez les champignons non mycorrhiziens et parasites sont inconnus. Nous profitons de cette relation tripartite et mycoparasitaire pour les étudier.

En règle générale et sous réserve de génomes nouvellement séquencés et rendus publics, le genre *Trichoderma* représenté à ce jour par 12 espèces présente en moyenne sept séquences MIP. *T. hamatum* se distingue avec 6 membres, tandis que *T. harzianum*, *T. guizhouense* et *T. virens* se distinguent avec 8 membres. Par ailleurs, toutes les espèces de *Trichoderma* possèdent les 3 sous-familles principales : les AQP orthodoxes qui sont entre 2 et 3 membres selon les espèces de *Trichoderma*, les AQGP (aquaglycéroporines) entre 3 et 4 membres, puis les XIP (X-Intrinsic Proteins) représentées par un membre unique sauf chez *T. virens* avec la présence de deux membres. Ces données sont intéressantes car comparativement à son hôte *F. solani* qui ne présente que 5 membres MIP, ou à *F. oxysporum* et de *F. lycopersici* (6 membres), elles montrent une conservation des AQP et des XIP entre ces deux Ascomycètes alors qu'une duplication des AQGP accompagnée de leur diversification semblent s'être opérée chez *Trichoderma*. Ces deux clades partagent les AQGP de type Fps-like. Cependant, tandis que les *Fusarium* ne présentent qu'un seul membre, les *Trichoderma* en possèdent au minimum 2 voire 3 pour *T. harzianum*, et avec une large diversité de séquences. De même, les *Trichoderma* présentent des AQGP particulières dites de type "Others" ou "Autres" (Xu et al., 2013). *Trichoderma* et *Fusarium* présentent des modes de vie relativement contrastés, aussi nous émettons l'hypothèse que les AQP et au moins une Fps-like partageraient des fonctions communes entre ces organismes, tandis que les autres AQGP joueraient des rôles particuliers chez *Trichoderma*. Cette thèse ne répond pas spécifiquement sur les fonctions putatives des MIP chez ces organismes. Cependant, les analyses des éléments *cis*-régulateurs au niveau des promoteurs des gènes transcrits et des structures tridimensionnelles des protéines apparentées accessibles par le prisme d'une modélisation dite par homologie nous offrent quelques pistes de réflexion très prometteuses.

Chez *Ths97*, quatre MIP semblent transcrites : une AQP (98742), deux AQGP avec la Fps-like (90014) et l'AQGP-"Others" (92358), ainsi que l'unique XIP (488926). Ces expressions sont observées chez *Ths97* cultivé en milieu artificiel, mais également lorsqu'il est en contact avec les racines d'olivier. Cependant, l'expression de ces gènes semble plus forte chez *Ths97* en relation avec la plante, à l'exception de celui codant la Fps-like dont l'expression apparaît fortement inhibée. Mais plus intéressant encore, ces 4 MIP sont significativement surexprimées chez *Ths97* en situation de contact avec son hôte *Fso14*. Exactement, ces surexpressions sont plus élevées au niveau de la zone de confrontation, mais sont déjà significativement observables dans les zones où *Ths97* n'est pas encore en contact avec son hôte. Ces données d'expression montrent que *Ths97* répond à la présence d'un champignon étranger en reprogrammant sa transcription, et que ces reprogrammations se réalisent certes en contact direct avec sa cible mais également sans contact physique. A l'instar de n'importe quel organisme uni- ou pluricellulaire, il est attendu que *Ths97* soit sous la gouverne de signaux extérieurs, volatiles ou diffusibles. Ces signaux peuvent émaner de *Fso14*, et tout naturellement au niveau des zones de contact physique entre les hyphes.

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

En effet, ce dernier en tant que proie, devrait répondre tout comme un organisme évoluant sous une contrainte sévère. De même, il n'est pas exclu que ces signaux émanent de *Ths97* lui-même, au niveau des zones de confrontations, et que ces signaux se transmettent d'hyphes en hyphes de manière systémique (telles des substances hormonales). Quelles que soient l'origine et la nature des ces signaux, les décrypter serait fondamental et très informatif. Ces connaissances participeraient à enrichir les réseaux de communication qui animent les réponses cellulaires dans le modèle fongique qui sont encore peu compris en situation de mycoparasitisme.

Ces quatre MIP furent nos cibles pour étudier dans un premier temps les motifs régulateurs *cis* de transcriptions. Nous avons mené cette étude *in silico* sur 1500 bases en amont du codon "start" de traduction. Différentes banques de données dédiées à ces motifs de régulations sont disponibles. Elles sont établies et enrichies sur le modèle levure, et quand bien même elles sont comparativement moins fournies que celles dédiées aux modèles végétal et animal (humain en l'occurrence), elles offrent de nombreux renseignements très intéressants. En effet et de manière inattendue, nous enregistrons une forte à très forte représentativité (ie 62 à 81%) de motifs régulés par des sources carbonées, azotées et phosphorées, ou alors impliqués dans la mise en place de divers processus métaboliques primaires. Les motifs consacrés aux réponses cellulaires associées aux stress biotiques et abiotiques sont de l'ordre de 1 à 2 unités (soit maximum 0,05% des motifs totaux) voire absents. Ces taux sont très surprenants en comparaison à ceux retrouvés dans les promoteurs des gènes MIP du règne végétal par exemple, représentés massivement par des motifs impliqués dans les réponses de défenses de la plantes (Yamada et Bohnert, 2000; Li et al., 2009-2013; Lopez et al., 2013). Ces résultats appuient notre hypothèse selon laquelle les MIP seraient des acteurs protéiques impliqués dans l'établissement des modes trophiques déployés par *Trichoderma*, dont l'hyperparasitisme.

Dans un second temps, nous avons cherché à modéliser la structure des MIP qui s'expriment chez *Ths97*. Cette modélisation structurale a été réalisée en collaboration avec Daniel AUGUIN, biochimiste structuraliste à l'Université d'Orléans. Parce que la modélisation ne peut s'effectuer que sur des séquences protéiques dans leur intégralité de longueur, cette étude ne fut pas menée spécifiquement sur les MIP de *Ths97* mais sur celles issues de l'espèce *T. harzianum* CBS 226.95 séquencée et disponible sur le portail génomique "Joint Genome Institute" (JGI). Nous avons tenté de travailler avec les séquences MIP de *Ths97*, nous obligeant alors à les séquencer dans leur pleine longueur. Techniquement, cette étape préalable nécessite des amorces spécifiques capables de s'hybrider avec les régions flanquantes non traduites en 3' et 5' de chaque MIP. Ces régions sont inconnues chez *Ths97* et *a priori* suffisamment différentes de celles retrouvées chez l'espèce séquencée pour que, même avec l'utilisation de couples d'amorces "dégénérées" conçus par alignement de séquences de plusieurs régions homologues issues d'espèces de *Trichoderma* phylogénétiquement très proches, nous ne sommes pas parvenus à amplifier les séquences MIP correspondantes. Cependant, les régions génomiques codantes, sont quant à elles très semblables et codent des protéines avec en moyenne 98% d'identité. Ces niveaux nous autorisent à travailler en toute confiance avec les séquences de *T. harzianum* CBS 226.95.

Ainsi, plusieurs pistes de mécanismes régulateurs furent analysées et présentées. Les alignements par groupe phylogénétique des 4 MIP exprimées montrent qu'en dehors des extensions variables aux deux extrémités, deux groupes de MIP se distingueraient selon leur capacité de transport de solutés: un premier groupe avec les AQP et les XIP qui transporterait de l'eau et par extension du peroxyde d'hydrogène (deux molécules ayant

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

un encombrement stérique et une polarité quasi similaires), puis un second groupe avec les AQGP incluant les Fps-like et les AQGP-"others" qui seraient des transporteurs probables d'alcools polyhydroxyliques (ou polyols). Cette ségrégation pourrait être étendue aux autres membres de chaque sous-groupe en raison de leur proximité intra-locale.

Les premières différences pour justifier cette ségrégation sont situées au niveau du site de constriction dans le pore central, c'est-à-dire le filtre Ar/R. Celui-ci est légèrement plus petit chez l'AQP et la XIP et est composé de 4 résidus, alors qu'il est un peu plus lâche chez les AQGP et est composé soit de 4 résidus dont l'un est relativement plus "petit" (Alanine) soit seulement de 3 résidus (le quatrième étant remplacé par une glycine). La disposition particulière de ces résidus entre sous-groupes offre respectivement des diamètres de constriction d'environ 1,2Å et 1,8Å pour l'AQP et la XIP, puis de 3,78Å et 2,54Å pour les *Fps-like* et AQGP-"others". Ces diamètres d'ouverture conditionnent de manière sélective le transport des molécules d'eau ou de molécules plus volumineuses comme le glycérol. Il est cependant important de préciser que ces valeurs sont légèrement sous-estimées du fait du mode de mesure proposé par le logiciel employé (MOLE2). L'eau présente un diamètre idéalisé de 2.8 Å, mais il est fondamental de garder à l'esprit l'image qu'une protéine "respire", entendons qu'elle est animée en continu de mouvements, ce qui laisse un panel d'adaptation tridimensionnelle possible dans un système dynamique. Ainsi, la chaîne latérale de l'arginine au centre de ce filtre peut notamment occuper plus ou moins le passage lors de ces changements conformationnels, autorisant alors le flux de certains solutés.

Un autre point de distinction entre ces MIP concernerait les boucles extracellulaires C et E. Conjointement à la composition en acides aminés du cœur du canal, ces boucles réguleraient la diffusion des solutés. Ainsi chez les glycéroporines, les boucles C présenteraient une topologie commune en épingle alpha dont la deuxième hélice apparaît dans ces cas avec une tendance hydrophobe. En outre la longueur et la composition en résidus diffèrent significativement de celles des AQP strictes. Ainsi, cette boucle C qui peut être suspectée d'interaction avec des partenaires régulateurs, présente des sites interactifs différentiels, donc *a priori* des couplages à des partenaires différents. Quant à la boucle E, elle compose la seconde hémi-hélice. Celle-ci est relativement hydrophobe et elle intègre certains acides aminés constituant les motifs régulateurs Ar/R et NPA situés au cœur du canal. Elle est également plus longue d'un tour (4 résidus de plus par rapport à l'archétype de l'AQP standard). Les résultats semblent suggérer l'existence d'un pont salin interne entre l'aspartate conservé à côté de l'Arginine du motif Ar/R et une nouvelle arginine située à un tour d'hélice sur la face enfouie contre la dernière hélice a-6. Une extinction de charges dans une interaction électrostatique dans ce contexte hydrophobe contribuerait éventuellement à tendre très légèrement l'hémi-hélice NPA. Ces charges ne peuvent trouver d'autre partenaire et à défaut une contrainte supplémentaire s'exerce sur ce petit élément de structure secondaire qui en se replaçant par rapport à son homologue dans une aquaporine plus orthodoxe avec motif NPARS (la serine pointant dans un environnement polaire à l'opposé de l'aspartate dont il est question) modifie légèrement le diamètre d'ouverture du canal tel un diaphragme. En effet dans une comparaison entre AQP stricte et AQGP il est imputable à cette configuration que la partie radicalaire de l'arginine soit décalée d'environ 1Å de sa position canonique. Ce décalage somme toute réduit (moins d'une liaison carbone-carbone) est néanmoins significatif à l'échelle de la molécule et contribue à un espace libre supplémentaire à l'intérieur du canal. Cette double contrainte est partagée par les AQGP, mais absente des AQP et la XIP exprimée. Elle répondrait parfaitement aux hypothèses de fonction de transport de solutés relativement volumineux que ces AQGP seraient capables

Question 2 Les perméases MIP seraient elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma harzianum*?

d'assurer, certes le glycérol mais également des polyols plus longs comme le sorbitol, l'érythritol, l'arabitol, le sorbitol ou le mannitol. Ces molécules sont connues pour alimenter le métabolisme général ou pour participer au maintien de l'intégrité cellulaire en situation de stress environnemental, y compris chez les champignons. Par ailleurs ces hypothèses sont étayées par quelques données bibliographiques, notamment issues de travaux menés sur des MIP de *Plasmodium falciparum* (pfAQP), *Escherichia coli* (AqpZ) ou *Acyrtosiphon pisum* (ApAQP2) (Beitz et al., 2004; Wallace et al., 2012).

Une dernière nuance subtile mais néanmoins intéressante mérite d'être exposée et concerne la boucle intracellulaire B. Celle-ci correspond à la première hémi-hélice, et renferme le premier motif NPA. Elle s'insère à l'intérieur du canal formé par les 6 passages transmembranaires pour former le site de constriction le plus étroit (conjointement à la boucle E). Il s'avère que les charges nettes de cette boucle sont totalement différentes entre les 2 AQGP exprimées, elles-mêmes présentant des régulations contraires *in planta* en situation de mycoparasitisme (*ie* Fps-like régulée positivement, et l'AQGP-"Others" régulée négativement). Ainsi cette boucle est significativement plus basique chez les Fps-like avec des points de charge supplémentaires. Ces nuances devraient se répercuter dans les fonctions de sélectivité des pores vis-à-vis de solutés particuliers, comme dans leur capacité d'interaction avec des régulateurs spécifiques qui restent à découvrir ou, éventuellement, dans leur capacité à favoriser une direction de circulation des polyols de part et d'autre de la membrane.

Par comparaison aux MIP bien caractérisées chez *Plasmodium* ou *Escherichia* par exemple, ces données *in silico* fournissent un aperçu certes théorique mais relativement très proche de la réalité des propriétés de perméabilité potentielles qu'assureraient ces canaux chez *T. harzianum* dans le transport de l'eau ou de polyols. Ces transporteurs de polyols fonctionneraient parallèlement aux transporteurs spécifiques de sucres, alimentant le métabolisme général du champignon en carbone. De même, et en parfaite ligne avec les activités mycoparasitaires de *T. harzianum*, ces canaux pourraient participer à charger en polyols les extrémités des hyphes, créant une élévation subséquente et continue des pressions hydrauliques (A_w) *a priori* nécessaires pour briser la surface des parois cellulaires des hyphes de son hôte (déjà fragilisées par des attaques enzymatiques), et le pénétrer pour s'approprier son contenu dissout, organique et inorganique, c'est-à-dire les briques de la vie (Beitz et al., 2004 ; Dietz et al., 2011 ; Xu et al., 2013).

En conclusion à ce second chapitre, nous sommes en mesure d'avancer qu'il existe une forte présomption pour que les MIP modulées chez *Trichoderma* en situation d'antagonisme soit *in planta* soit *in vitro* soient impliquées dans les réseaux trophiques que *Trichoderma* met en place avec son environnement, en l'occurrence la plante et son champignon hôte *F. solani* *Fso14*. Les perspectives à ce travail seront apportées en fin de mémoire, et intégrées à celles du chapitre précédent.

5

Chapitre



Conclusion

et

Perspectives

Conclusion et Perspectives

Dans la nature, les plantes sont continuellement exposées à un large éventail d'agressions extérieures dont l'origine peut être biotique ou abiotique. Parmi ces plantes, celles issues de cultures intensives paient un très lourd tribut au parasitisme. Alors que dans la plupart des cas les plantes n'expriment pas de réactions spécifiques à ces menaces, des symptômes morbides plus ou moins drastiques peuvent alors apparaître. La variabilité des résistances, qu'elles soient spécifiques ou communes (Thrall et al., 2001; Salvaudon et al., 2008 ; Soubeyrand et al., 2009), peut être potentialisée par l'emploi d'agents bénéfiques protecteurs. Ces agents qui expriment généralement des comportements antagonistes envers de nombreux agents phytopathogènes sont de plus en plus utilisés en biocontrôle. Ce moyen de lutte phytosanitaire est donc une des alternatives à l'emploi des pesticides de synthèse chimique.

Ces agents, certes bénéfiques en agronomie, expriment au préalable ces aptitudes naturellement dans un sol ou au sein d'un organisme. En effet, avant d'être réorientés vers une "option anthropique", ils évoluent originellement dans des communautés d'organismes procaryotes et eucaryotes extrêmement riches et dont les relations inter-organismes qui harmonisent ces communautés sont remarquablement complexes. Comprendre comment les co-adaptations s'opèrent entre les pathogènes et leur hôtes -des relations parasitaires déjà extrêmes et complexes et qui peuvent être éventuellement bouleversées par la présence d'agents antagonistes -opportunistes ou non- reste une question clé de la biologie évolutive, théorique comme empirique, que de nombreux chercheurs notamment en phytopathologie végétale tentent d'approfondir. D'un point de vue écologique, et pour rester focaliser sur des relations parasitaires dont les bases obéissent au concept du "triangle de la maladie" (Agrios, 2005), le devenir de chaque type d'interactions inter-espèces ne se résume pas qu'aux performances génétiques de chacun des protagonistes, mais aussi et surtout aux environnements abiotiques et biotiques dans lesquels évoluent ces pathosystèmes, qu'ils soient plantes hôtes/parasites ou pathogènes fongiques hôtes/hyper(myco)parasites. L'influence de l'environnement génère donc des variations spatiales et temporelles significatives dans les dynamiques co-évolutives de l'ensemble des interactions qui crée ces communautés d'organismes (Forde et al., 2004; Lopez-Pascua et al., 2010). Mais à notre connaissance, très peu d'études menées sur le terrain documentent aujourd'hui les événements co-évolutifs d'une relation tripartite impliquant des plantes, leurs agents pathogènes et leurs hyperparasites bénéfiques, et qui surviendraient au travers de plusieurs générations à court et moyen-long termes.

Malgré tout, les données qui décrivent les relations tripartites et qui s'inscrivent dans des stratégies de contrôle biologique de ravageurs et de parasites sont abondantes. Elles offrent donc un socle suffisamment solide afin d'explorer exhaustivement une relation tripartite qui ne fut pas encore étudiée [olivier/*F. solani*/*T. harzianum*], ainsi que de fixer avec confiance quelques concepts fondamentaux.

L'olivier a façonné au fil de l'histoire de l'Humanité les paysages, les cultures et les patrimoines gastronomiques du pourtour méditerranéen qui est, encore aujourd'hui, le principal bassin de transformation et commercial de l'huile d'olive. La Tunisie, avec une forêt oléicole de près de 83 millions d'oliviers se hisse parmi les principaux producteurs et exportateurs mondiaux d'huile d'olive. Par conséquent, le fruit olive mais surtout son produit de transformation majeur, à savoir l'huile, sont considérés *de facto* comme des composantes stratégiques d'exportation internationale. La filière oléicole est donc primordiale pour la Tunisie, dynamisant plusieurs secteurs : économiques (agricoles et agroalimentaires :

Conclusion et Perspectives

oléifacteurs, oléitransformateurs et exportateurs), sociétaux (création d'emploi, limitation des exodes ruraux, maintien de la sécurité alimentaire) et environnementaux (préservation et valorisation naturelles d'espèces oléagineuses, et par extension de l'environnement agricole global). Aussi, dans des perspectives de développement durable, une veille est-elle particulièrement assurée à chaque étape de valorisation de l'huile d'olive, de la plantation des oliviers jusqu'au consommateur final. Cette démarche proactive intègre, entre autres, les gestions anticipatives et préventives des risques phytosanitaires. En effet, à l'instar de nombreuses plantes d'intérêt agronomique, l'olivier est la cible de nombreux agents phytopathogènes (Boulila, 2001). Ces attaques sont récurrentes, et elles se traduisent généralement par des chutes de productions et donc des pertes économiques significatives. Parmi les nombreux pathogènes qui choisissent comme plante hôte l'olivier, l'agent cryptogame *Fusarium solani* fait partie des principaux. Il est responsable des pourritures racinaires ou du collet. Peu d'options sont offertes aux producteurs pour lutter contre la fusariose sur olivier, si ce n'est l'utilisation de fongicides. Bien que les formulations utilisées soient efficaces pour contrôler *F. solani*, il n'en reste pas moins que leur pulvérisation répétées engendrent de nombreuses conséquences collatérales pour l'environnement mais aussi pour les consommateurs. Différentes méthodes de lutte existent, cependant leur efficacité ne sera véritablement garantie que si elles sont déployées en synergie. Parmi ces méthodes de lutte, la lutte biologique et plus spécifiquement le biocontrôle par utilisation d'agents antagonistes reste paradoxalement sous exploitée. Elle a pourtant prouvé à maintes reprises son efficacité sur différentes cultures (Osburn et al., 1995 ; NRC Report, 1996). Plusieurs agents microbiens sont ainsi employés en biocontrôle, dont des souches fongiques appartenant au genre *Trichoderma* (Naher et al., 2014). Il en va de même avec certaines substances actives antifongiques de *Trichoderma*, car parce qu'ils sont considérés comme des biofongicides beaucoup moins nocifs et surtout biodégradables, ces produits dérivés obtiennent encore plus d'attention et peuvent devenir la prochaine génération de pesticides biologiques. L'obtention de souches à haut potentiel de contrôle biologique est donc la condition *sine qua non* pour répondre à cet enjeu. Cependant, au préalable, il est nécessaire de caractériser le plus finement possible le comportement de ces souches sur l'agent phytopathogène, quel que soit leur environnement d'évolution (*in planta*, en serre ou en champs, *in vitro* etc), ainsi que certains des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à un potentiel comportement antagoniste.

Dr Mohamed Ali TRIKI, chercheur à l'Institut de l'Olivier à l'Université de Sfax, a isolé puis identifié une souche de *T. harzianum*, *Ths97* (Triki and Priou, 1997). Son objectif était de trouver une souche de *Trichoderma* à fort potentiel antagoniste. Cette souche est d'autant plus opportune pour nos travaux qu'elle provient de sols agricoles tunisiens, tout comme la souche pathogène de *F. solani*. Cette démarche de travailler avec des souches indigènes c'est-à-dire issues d'une même aire géographique est éminemment précieuse, car si cette souche répond à nos attentes, son exploitation sur des oliveraies ou d'autres cultures locales présentera moins de risque pour l'équilibre de l'écosystème qu'une espèce nouvelle. De plus, nous pouvons émettre raisonnablement l'hypothèse qu'elle présente d'emblée toutes les caractéristiques nécessaires pour une acclimatation aisée et rapide sur des oliveraies tunisiennes. En effet, l'efficacité constatée au champ est souvent très variable (Alabouvette et al., 2006). Et par rapport à ce dernier point, deux attentions particulières doivent être apportées lors de la sélection de souches antagonistes : (i) elles doivent être aptes à s'intégrer et à persister de manière pérenne dans l'agrosystème à protéger, et (ii) sachant que le biocontrôle ne doit pas être raisonnablement appliqué de manière exclusive, tout du

Conclusion et Perspectives

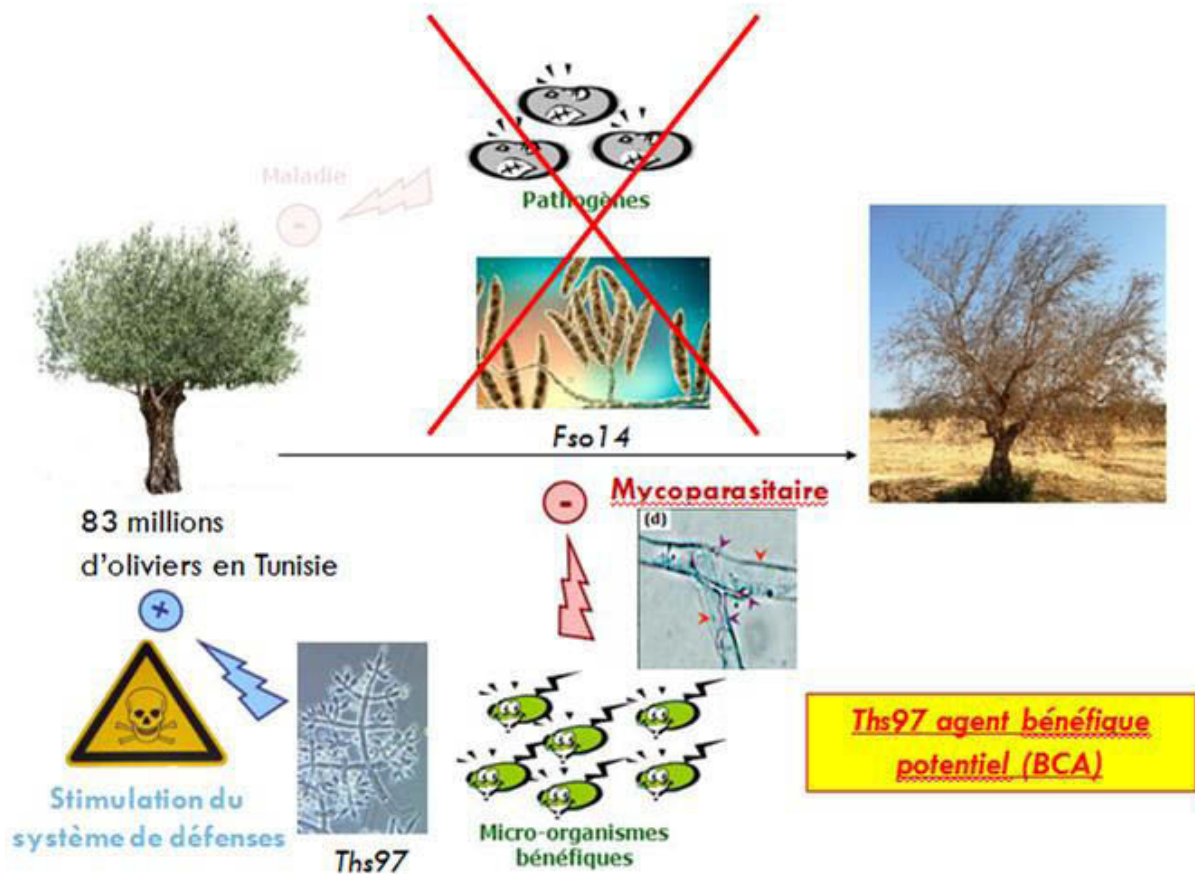


Figure 21. Schéma Tripartie Olivier - *Trichiderma harzianum* - *Fusarium solani*

Conclusion et Perspectives

moins dans les premiers temps de son application sur une culture implantée depuis longtemps et sur une même aire géographique, ces souches doivent être compatibles avec les pratiques culturales du végétal cultivé déjà en vigueur, comme par exemple vis-à-vis des pesticides chimiques employés. Inévitablement, ces derniers peuvent inhiber ou fortement entraver le développement de ces BCA et par conséquent leur action bénéfique (Alabouvette et al., 2006 ; Edel-Hermann et al., 2009 ; Gerbore et al., 2013ab ; Vallance et al., 2009).

Aujourd'hui encore, et malgré leur potentiel agronomique indéniable, peu de BCA font l'objet d'homologation ou sont employés par les agriculteurs. Leur caractérisation exhaustive est une démarche donc essentielle afin d'apporter toutes les chances possibles pour que le biocontrôle soit plus largement adopté. Cette thèse, à travers ses questions multidisciplinaires, a pour missions d'accompagner ce mouvement, déjà en tentant d'apporter quelques éléments de réponses qui puissent participer à répondre à cet enjeu appliqué et stratégique.

Les résultats obtenus sont très encourageants (figure 21). Mais de nombreuses questions restent sans réponse, offrant plusieurs pistes d'études et d'applications alors envisageables :

Evaluer les mécanismes antagonistes par antibiose de *Ths97*

L'antibiose est probablement un des mécanismes le mieux caractérisé et peut-être le plus important déployé par les agents bénéfiques pour limiter l'invasion d'agents phytopathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène suite à la production d'enzymes hydrolytiques diffusibles et de métabolites spécifiques (diffusibles et/ou volatiles) présentant des propriétés antifongiques et/ou antibiotiques.

Les espèces de *Trichoderma* sont connues pour produire plusieurs de ces métabolites. Leur caractérisation peut s'avérer un atout majeur dans la lutte biologique. Il serait donc pertinent de caractériser les mycotoxines potentielles sécrétées par *Ths97*. S'il s'avère que certaines d'entre elles sont efficaces contre le développement des hyphes ou la germination des spores de *Fusarium* (dont *Fso14*) ainsi qu'envers d'autres agents cryptogames, leur utilisation directe ou en synergie avec leur organisme d'origine devra être réfléchi. Cependant, la production de ces mycotoxines s'opère de manière différentielle selon les conditions environnementales auxquelles les souches sont confrontées (*i.e.* sol, plante, agent pathogène). Cette évaluation devra donc tenir compte de l'environnement où évoluera *Ths97*, et dans un contexte où certaines mycotoxines d'intérêt ne seraient pas sécrétées tel espéré, des applications extérieures de ces métabolites voire l'utilisation de mutants particuliers de *Ths97* pourraient être envisagées.

Autres facteurs de pathogénie potentiellement déployés par *Ths97*

Pour rester sous le prisme moléculaire de l'interaction et à la manière de nombreux travaux de recherche ciblant ces relations tripartites, il serait très intéressant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de pathogénicité que *Ths97* déploierait envers son hôte *Fso14*. Il s'agit notamment de l'étude des facteurs de pathogénie, des toxines, d'enzymes hydrolytiques dégradant les parois cellulaires (CWDE), de détoxication, et d'autres mécanismes moléculaires directement liés à la capacité de l'hyperparasite d'accéder, d'attaquer puis le cas échéant de tuer son hôte. Ces facteurs de pathogénie sont des pistes très précieuses, pour répondre à des enjeux phytopathologiques mais également en bioingénierie (fabrication de biocarburants, biodégradation de matériaux etc). Parce que

Conclusion et Perspectives

nous estimons que la finalité de cette relation parasitaire s'inscrit dans une situation trophique (un mode de vie pathogène se caractérise par définition par une dépendance métabolique sur un hôte), il serait également très original d'avoir une vision la plus large possible des mécanismes d'internalisation des molécules "nutritives". Certaines familles de transporteurs font l'objet de recherches poussées, cependant leur très grande diversité laisse encore de larges champs qui sont à explorer exhaustivement. Comprendre la mise en place et les régulations d'un tel réseau transmembranaire ("food wide web") permettra aussi de comprendre comment le parasite s'adapte à l'évolution d'environnements nutritionnels toujours fluctuants.

Comment s'installe *Ths97* au niveau des racines d'olivier ?

Trichoderma occupe une place prépondérante au sein de la rhizosphère. De même, il a été démontré que certaines souches de *Trichoderma* qui répondent au critère de BCA seraient capables d'entretenir une relation très particulière avec la plante en assurant une colonisation durable de ses racines. Cependant, contrairement à la colonisation d'autres BCA biostimulateurs (bactéries etc), *Trichoderma* coloniserait de manière très superficielle les assises pilifères. En effet, seules quelques couches de cellules sous-épidermiques hébergeraient le champignon. Mais cette colonisation "superficielle" serait responsable de l'amélioration locale et systémique de l'immunité générale de la plante hôte.

Il serait donc très important de bien comprendre les relations que *Ths97* instaure avec les racines de l'olivier. Outre l'aspect fondamental, ces études contribueront à mieux comprendre les capacités de survie et de maintien de *Ths97* au sein d'une rhizosphère. De telles connaissances sont très précieuses, notamment, dans l'aide à la décision de nombreux programmes d'élaboration et/ou d'optimisation d'application d'un tel BCA au sein d'une rhizosphère donnée.

Que transportent les MIP de *Ths97* ?

Parmi les 8 membres MIP que le génome de *Ths97* présente, 4 sont transcrites constitutivement, et induites de manière différentielle en situation de parasitisme. Afin de les placer définitivement dans un contexte nutritionnel, il sera nécessaire de vérifier deux points : (i) les capacités de transport pour différentes molécules organiques et minérales, ces molécules étant connues pour intégrer le métabolisme général du champignon, (ii) et que ces MIP soient bien nécessaires à la vie (et/ou survie) du champignon.

Cette double validation fonctionnelle s'opèrera respectivement à l'aide de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou d'oocytes de xénope transfectés par des MIP issues de *Ths97*, ainsi qu'à l'aide de mutants de *Ths97* délétés spécifiquement de telle ou telle MIP.

Ces expérimentations apporteront d'importantes informations pour asseoir le bien-fondé de notre seconde hypothèse de travail.

Explorer la promotion de croissance des plantes

L'inoculation des jeunes plants d'olivier a provoqué un événement totalement inattendu, la chute d'un nombre significatif de feuilles. Cependant, après quelques semaines seulement, ces plants ont très rapidement développé de nouvelles jeunes pousses. De même, nous avons constaté que *Ths97* favoriserait le développement racinaire de ces mêmes jeunes plants. Pour ce dernier point, nous sommes conscients qu'aucune appréciation statistique n'a été menée. Néanmoins, une tendance -certes visuelle- semble se dégager. Bien que ces événements n'aient pas été discutés en profondeur lors de la valorisation de nos résultats, ces données peuvent être sources d'informations très utiles.

Conclusion et Perspectives

De nombreuses études ont clairement démontré le comportement biostimulateur de différentes espèces de *Trichoderma*, qu'il soit en présence de leurs cibles fongiques ou non (Hibar et al., 2005). D'un point de vue des mécanismes moléculaires mis en jeu, il semblerait que certaines souches de *Trichoderma* aient l'aptitude à sécréter des molécules mimant certaines phytohormones tel l'AIA (l'acide indole acétique), notamment connu pour être impliqué dans l'activation de l'organogenèse du système racinaire des plantes (Gravel et al., 2007 ; Salas-Marina et al., 2011 ; Sofo et al., 2011). La surface des racines étant ainsi amplifiée, l'absorption des éléments nutritifs (eau et sels minéraux) s'intensifierait. De plus, cette action directe de *Trichoderma* sur l'architecture racinaire aurait pour effet induit l'accélération et/ou le renforcement du développement des parties aériennes de ces mêmes plantes.

Nous n'avons pas spécifiquement étudié ici si *Ths97* développait la capacité de promouvoir une meilleure croissance des plants d'oliviers. Cependant, il serait très important d'analyser ce potentiel biostimulateur sur de jeunes arbres et également sur des arbres en plein âge de production. En effet, tout comme certaines souches de PGP-R (*Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* ou *Rhodobacter*) sur plantes annuelles comme pérennes (Esitken et al., 2002 ; Lee et al., 2006 ; Orhan et al., 2006), *Trichoderma* est aussi connu pour accélérer la production en fruits de plantes cultivées (Gravel et al., 2007).

Quelle stratégie de traitements des plants d'olivier adopter avec *Ths97* ?

Nos travaux *in situ* ont été menés en serre sur de très jeunes plants. Bien que très informatifs, ils devront être étendus sur des plants plus âgés et en plein âge de production. Deux points seront à évaluer : la persistance de *Ths97* dans la rhizosphère où il sera appliqué, et les relations qu'il entretiendrait avec les autres populations de microorganismes indigènes.

Pour le premier point, la persistance physique de *Ths97* mais également de ses propriétés bioprotectrices devra être reliée au nombre d'applications nécessaire dans l'année et à la richesse de l'inoculum (effet population), afin d'assurer une colonisation durable de *Ths97* au sein de la rhizosphère. De même, la meilleure période d'application devra être définie, bien qu'il serait "logique" d'appliquer massivement l'agent phytoprotecteur en début de printemps. Quant au second point, il est important de garder à l'esprit qu'un apport massif d'un organisme (quel qu'il soit) dans un écosystème donné aura des répercussions plus ou moins prégnantes sur les relations qui unissent les populations d'organismes déjà installés dans cet écosystème. De manière inattendue, le bouleversement de ces relations pourrait avoir des effets collatéraux négatifs sur les relations qu'entreprendraient les plants cultivés avec ces populations indigènes, impactant directement et de manière inattendue le potentiel de production. Dans un contexte d'essais en lutte biologique ciblant des cultures stratégiques pour une région, il nous semble donc important d'apporter la plus grande attention sur la préservation de la diversité microbiologique des sols sur lesquels *Ths97* devra être "massivement" appliqué.

***Ths97* serait-il combinable aux luttes chimiques actuelles pour assurer le développement d'une stratégie de lutte intégrée ?**

Cette dernière question est cruciale, car l'idée que les luttes biologique et chimique s'opposent est incrustée dans la plupart des esprits. Cette dichotomie est pourtant réductrice car ces deux approches culturelles peuvent être employées de manière synergique pour protéger certaines cultures. Certes elles sont intrinsèquement difficilement comparables car

Conclusion et Perspectives

les organismes bénéfiques -parce qu'ils sont vivants- ont des particularités et des potentialités qu'une molécule chimique -inerte- ne possèdera jamais. La lutte biologique utilise des agents de biocontrôle en les inscrivant dans une relation dynamique avec le végétal dont les objectifs peuvent être multiples et les répercussions pérennes et préservatrices de l'environnement car elle a un spectre relativement restreint de ravageurs cibles ; quant au pesticide, il est une matière chimique active, aux actions immédiates mais dont l'efficacité s'exprime sur des périodes de temps relativement très courtes et de manière quasiment non spécifique sur une très large gamme d'espèces (nuisibles ou non, voire bénéfiques).

Un programme de protection intégrée, c'est-à-dire associant l'utilisation de certains produits chimiques en alternance avec l'application d'agents de biocontrôle (ou de produits "dérivés"), permettrait de diminuer l'application de ces pesticides de synthèse. L'objectif global d'un programme de protection intégrée n'est pas tant d'essayer d'éradiquer l'agent phytopathogène, mais de réduire l'impact des modes culturaux en vigueur sur l'environnement tout en préservant des niveaux de protection économiquement acceptables.

Si nous inscrivons *Ths97* dans cette voie, il sera donc très important de bien évaluer sa compatibilité avec les produits phytosanitaires chimiques utilisés. En d'autres termes, les formulations des pesticides ne devront en aucune manière entraver le bon développement de *Ths97*. De même, les fongicides ont la propriété d'impacter négativement les populations de microorganismes indigènes des sols, et donc les relations qui les unissent. Bien que *Ths97* soit une souche indigène, il devra évoluer dans des équilibres de forces entre populations de microorganismes bouleversés. Nous pouvons imaginer que l'organisme hyperparasite d'intérêt se retrouve parasité à son tour par d'autres hyperparasites pour lesquels les nouveaux équilibres relationnels les rendent globalement plus compétitifs. La pleine réussite d'un programme de protection intégrée sera d'autant plus garantie qu'il prendra en compte la persistance de l'agent bioprotecteur appliqué dans un environnement donné, sachant que cette persistance sera intimement liée à la diversité des interactions entre populations de microorganismes dont certains sont aussi potentiellement (myco)parasites, des interactions globalement impactées par les pesticides chimiques.

Ce point devrait être considéré avec la plus grande attention lors de la réalisation d'essais en lutte biologique.

En conclusion, les résultats issus de nos travaux de recherche et exposés au travers de cette thèse sont certes fondamentaux, mais bien qu'ils soient préliminaires, ils font partie intégrante des nombreuses pièces d'un large puzzle dont la finalité appliquée est la protection la plus respectueuse possible des oliveraies contre le développement d'une maladie cryptogamique, la pourriture fusarienne. Tel nous le précisons dans les parties précédentes, un champs d'étude considérable et scientifiquement très riche reste à explorer. Mais une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques et moléculaires que *Ths97* serait apte à déployer au sein d'écosystèmes divers et fluctuants s'appuiera sur le développement de différentes disciplines d'écogénomique fonctionnelle (telles l'écologie moléculaire, l'écophysiologie, la biologie moléculaire, la biochimie et la bioinformatique). Ainsi, la caractérisation la plus exhaustive possible de cette souche *Ths97* devrait constituer une des clés de voûte du développement de procédés plus efficaces et/ou plus durables pour la protection des cultures d'oliviers en Tunisie ainsi qu'à travers le monde.

6

Chapitre



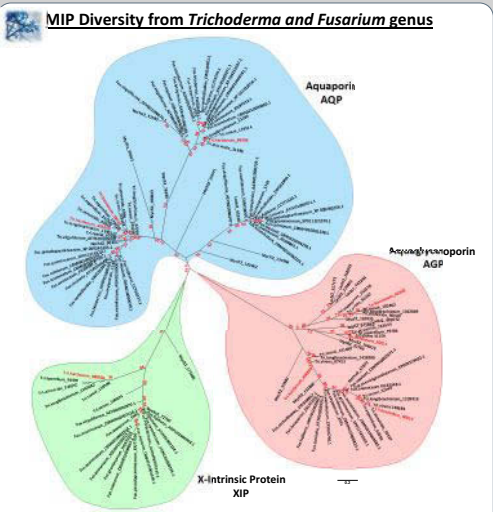
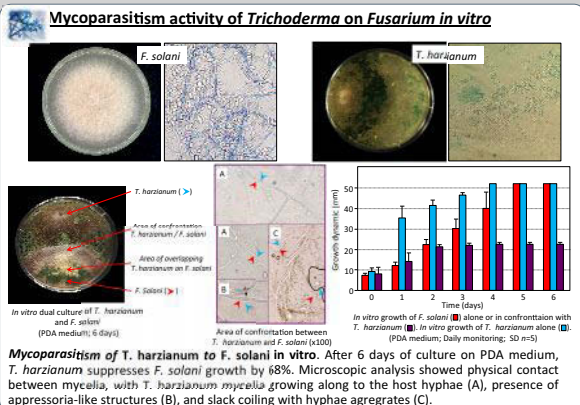
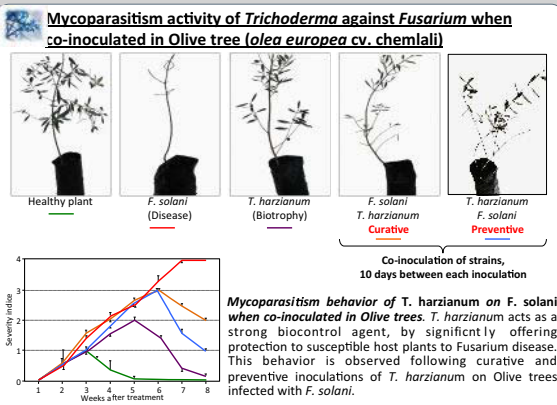
Listes des publications
et
activités scientifiques

MIP diversity from *Trichoderma harzianum*, and transcriptional regulation during its mycoparasitic association with *Fusarium solani* in Olive trees

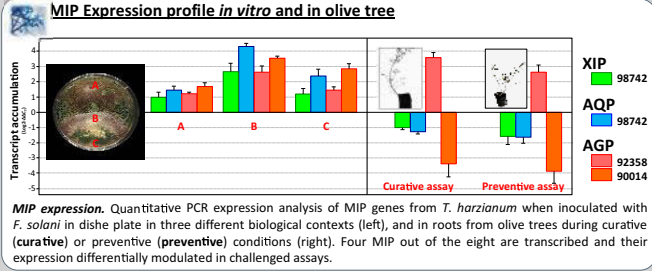
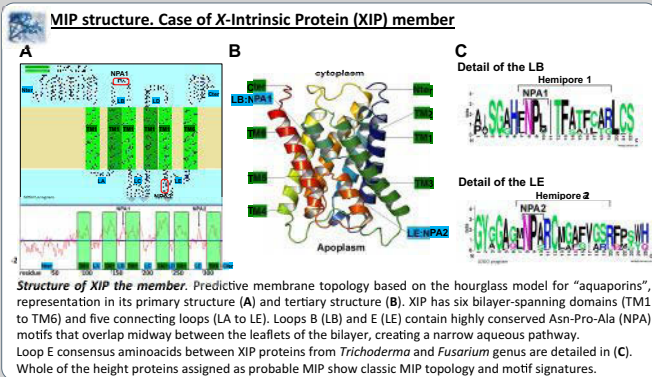
BEN AMIRA Maroua^{1,2}, KOUHAJA Ali⁴, TRIKI Mohamed Ali³, CHAAR Hatem¹, BRUNEL-MICHAC Nicole⁷, PUJADE-RENAUD Valérie^{2,5}, JULIEN Jean-Louis², AUGUIN Daniel⁶, VENISSE Jean-Stéphane^{2*}
Science Faculty of Bizerte, Sylvio-Pastor Laboratory of Tahrira, Tunisia; ¹INAF, Blaise Pascal University, France; ²Institut de l'Olivier, Sfax, Tunisia; ³National Agronomic Institute of Tunisia, Tunisia; ⁴CIRAD, UMR-AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France; ⁵BIGC, University of Orleans, France; ⁶maroubenamira@gmail.com; ⁷jstephane.venisse@univ-bpclermont.fr



Plant protection aims to reduce crop damage due to the activity of parasites. As an alternative to chemical pesticides, biocontrol is becoming more prominent. It can use fungal microorganisms including *Trichoderma* species. Olive crops are subjected to severe *Fusarium* attacks, and a new strain of *Fusarium solani* (Fos14) from Tunisia was recently characterized. We tested the protective activity of a local *Trichoderma* strains (*T. harzianum* T315) on this pathogen. First, we evaluated the mycoparasitism activity of *T. harzianum* T315 against *F. solani* *in vitro* and on Olive trees. We also explored the molecular mechanism driving the myco-heterotrophic behavior of *T. harzianum*. Among the large panel of permease families involved in the solute capture, we specifically focused on the Major Intrinsic Protein (MIP) family. Knowledge about these transmembrane proteins is paradoxically very limited in fungi, and thus requires more in-depth examination. This is particularly true for the last identified class of MIP identified in plants, the X-Intrinsic Protein, which is presented here.



Unrooted phylogeny of MIP proteins from *Trichoderma* and *Fusarium* genus. MIP from *Laccaria bicolor* (Lacbi2) and *Mycosphaerella fijiensis* (Mycfi2) were used as MIP subfamily references. Numbers at the nodes represent percent of bootstrap values (above 50%) based on 500 reassembling. *T. harzianum* MIP sequences are highlighted in red. AQP, Aquaporin; AGP, Aquaaglyceroporin; XIP, X-Intrinsic Protein. *Trichoderma* genus exhibits at least 7 MIP subdivided in the three subclasses found in fungi. *T. harzianum* shows 8 MIP, with 1 XIP, 4 AGP and 3 AQP.



Concluding remarks

This work set up to reach a double objective: to evaluate the mycoparasitism activity of a *T. harzianum* (strain T315) against *F. solani*, the pathogen agent of the fusarium root rot disease on Olive trees, and to highlight the diversity of the MIP permease potentially involved in the trophism of *T. harzianum* T315.

- *T. harzianum* significantly protects Olive against *F. solani* infestation by mycoparasitism. Further investigation will be necessary before proposing *T. harzianum* as a reliable candidate for the biocontrol of cryptogamic pathogens from soil in Tunisian olive plantations.
- We provided new insights into the MIP family in *Trichoderma* genus with at least 8 members per strain. Each MIP exhibits classic MIP structure. Several MIP (1 aquaporin, 2 aquaaglyceroporins and the sole XIP member) are expressed and modulated in *T. harzianum* during its mycoparasitic process against *F. solani*, we hypothesize that MIP, like other permease families, could be involved in *Trichoderma harzianum* mycoparasitism.

Listes des publications

XIV Meeting of the IOBC-WPRS Working Group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens": Biocontrol and Microbial Ecology.

Berlin Germany, 12-15 Septembre 2016.

Organisateurs : Pr. Dr. Eckhard George, Dr. Rita Grosch, Pr. Dr. Kornelia Smalla, Dr. Jurgen Kohl.

Présentation affichée

MIP diversity in *Trichoderma* species, and transcriptional modulation during its mycoparasitic association with *Fusarium solani* in olive trees

Maroua BEN AMIRA^{1,2,3}, Ali KHOUAJA⁴, MA TRIKI⁵, H CHAAR⁴, Valérie PUJADE-RENAUD^{1,6}, Jean-Louis JULIEN¹, Daniel AUGUIN⁷, Jean Stéphane VENISSE¹

¹Blaise Pascal University of Clermont-Ferrand, UMR 547 PIAF INRA (France)

²Science Faculty of Bizerte, Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka (Tunisia)

³Sylvo-Pastoral Institute, Sylvo-Pastoral Ressources Laboratory, Tabarka (Tunisia)

⁴National Agronomic Institute of Tunis, INAT (Tunisia)

⁵Institut de l'Olivier, Université de Sfax (Tunisia)

⁶CIRAD, UMR-AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand (France)

⁷University of Orléans, LBLGC (France)

Abstract:

The "fusarium rot" is a severe cryptogamic disease of olive trees (*Olea europaea*) caused by the soil-born fungus *Fusarium solani*. Control of this disease predominantly remains the use of pesticides, when an operational biocontrol by antagonism exists for decades. Because of multiple environmental and societal concerns, this alternative approach now enters a new era. It can involve fungal species of the *Trichoderma* genus exhibiting mycoparasitic activity. Recently, a new pathogenic *F. solani* strain has been isolated from the soil of Tunisian olive plantation. The mycoparasitic behavior of *Trichoderma* species against this new agent is unknown. The infestation modes of *Trichoderma* on some pathogenic fungi are well described. However the mechanisms related to solutes absorbotrophy are paradoxically not well known. It has been well established that various permeases are involved, but among several large transmembrane families, the Major Intrinsic Protein (MIP) has not yet been studied in a mycoparasitic context. Our aim is double: First, to test *T. harzianum* mycoparasitic behavior on *F. solani*, and second, to characterize of the MIP diversity and their modulation during myco-heterotrophic activity. Results show that *T. harzianum* exerts growth inhibition and potential mycoparasitism on *F. solani* during *in vitro* (Petri dish), as well as a protective role against the fusarium rot disease as *in planta*. Secondly, *T. harzianum* exhibits 8 MIP members: 4 aquaglyceroporins, 3 aquaporins and 1 X-Intrinsic Protein. This XIP draws particular attention and because it is the only member shared with plants, and its biological functions remains entirely unknown. Lastly, 6 members from these 3 MIP subclasses showed significant transcriptional modulations during the confrontation between *T. harzianum* and *F. solani*. These preliminary results provide information on the MIP diversity in *Trichoderma*, and the modulation of their expression during mycoparasitic interactions. A better knowledge of their role in this context may help optimizing the biocontrol of cryptogams in olive trees.

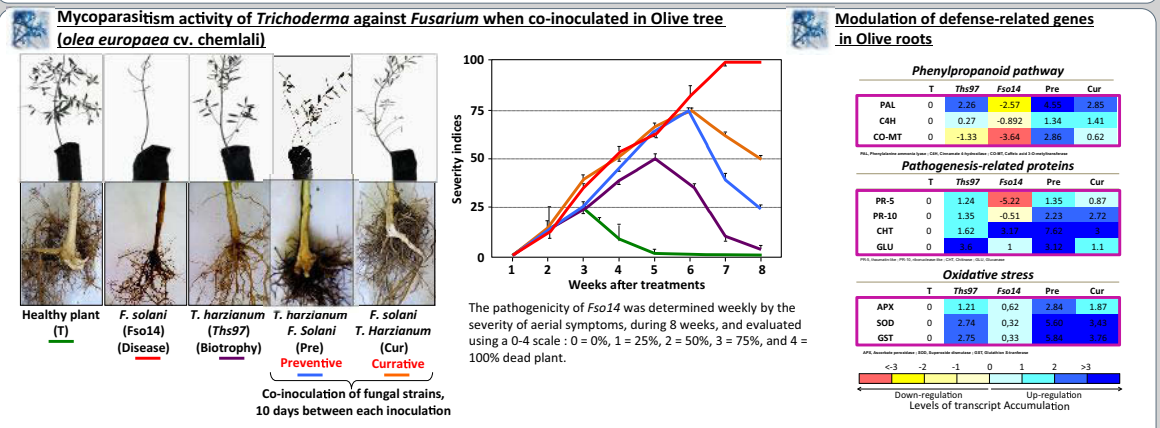


Use of *Trichoderma harzianum* as potential biocontrol agent against the *Fusarium* root rot disease on Olive trees

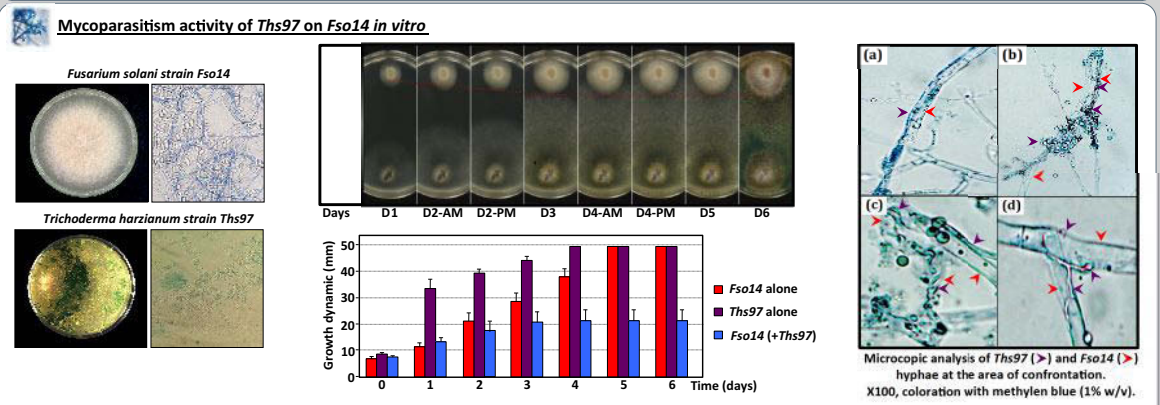


BEN AMIRA Maroua^{1,2}, LOPEZ David³, RIBEIRO Sébastien², KOUHAJA Ali⁴, TRIKI Mohamed Ali³, CHAAR Hatem⁴, BRUNEL-MICHAC Nicole², PUJADE-RENAUD Valérie^{2,5}, JULIEN Jean-Louis³, AUGUIN Daniel⁶, VENISSE Jean-Stéphane^{4*}
 *Science Faculty of Bizerte, Sylvio-Pastoral Laboratory of Tabarka, Tunisia; ¹PIAF, Blaise Pascal University, France; ²Institut de l'Olivier, Sfax, Tunisia; ³National Agronomic Institute of Tunisia, Tunisia; ⁴CIRAD, UMR-AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France; ⁵BLG, University of Orleans, France (0033753149932); jstephane.venisse@univ-bpclermont.fr

Tunisia is the largest olive-growing country in south Mediterranean, and is at the world's fourth position in trees number and the second in superficies. Olive is victim of attacks of pathogens, including cryptogams such as *Fusarium solani* that causes the root rot disease. *F. solani* provokes the rapid death of the most susceptible plants, which are for most of them domesticated cultivars of interest. To fight against root rot disease, farmers pulverize the chemical fungicide "Triazole". However, chemical treatments are not completely efficient and induce multiple environmental and societal concerns. For decades, several efficient alternatives have been tried including biocontrol. It consists in inoculating on plants of interest beneficial microorganisms (or antagonists), such as *Trichoderma* sp. These antagonists have the capacity to promote plant growth and to enhance their defenses. The aim of our study has been to analyze the behavior of potential biocontrol provided by the *T. harzianum* strain *Ths97* on the *F. solani* strain *Fso14*. Both fungi come from Tunisian agricultural soils. We tested *Ths97* ability to parasitize *Fso14* *in vitro*, and to modulate some defense-related genes into the roots. These host defenses include genes encoding for proteins involved in the oxidative stress, and the accumulation of PR-proteins and phenolic compounds. It is expected through these work to better understand of the multiple mechanisms deployed by *Ths97* to suppress the spread of *F. solani* *Fso14*, and therefore, to provide valuable guidance for a wider use of *T. harzianum* *Ths97* for a biological control of root rot in Olive trees.



Biocontrol agent *Ths97* acts as a strong biocontrol, beneficial agent on Olive trees. It significantly offers protection to susceptible host plants against *Fso14* infestation spread. This protective effect is strongest with a preventive inoculation of *Ths97* before *Fso14* infestation.
Root defense-related mechanisms enhancer *Ths97* up-regulated defenses-related genes in roots when *Fso14* tends to suppress them. Remarkably, *Ths97* highly potentiates these gene modulations when it is inoculated in combination with its prey *Fso14*. This especially concerns preventive context, resembling plant priming effects.



Biocontrol agent *Ths97* definitively inhibits the *Fso14* hyphal growth when the contact between fungal hyphae occurs. In fine, *Ths97* mycelium fully overwhelms *Fso14* mycelium which changes its pigmentation.
Mycoparasitism ability Microscopic analysis at the confrontation zone between *Ths97* and *Fso14* clearly shows parasitism behaviour of *Ths97* (such as a hyper-parasit or a mycoparasit) on *Fso14* (its host prey). This trophic event involves a *Ths97* mycelia growth along those of its *Fso14* prey (abcd), several *Fso14* cell deformations (ie cell collapse) and *Ths97* spores aggregates on *Fso14* hyphae (b), some *Ths97* coiling around *Fso14* (c), and presence of appressoria-like structures (d).

Concluding remarks

We show that *T. harzianum* strain *Ths97* presents an efficient antagonistic control, and might possess several of the main mycoparasitic mechanisms on its cryptogamic prey. In addition, we also prove that *Ths97* is able to set up an enhanced protection level in Olive roots, which is correlated with the activation of an array of defense-related pathways. More interestingly, under dual installation of *Ths97* with its prey *Fso14*, these same defenses were up-regulated even more significantly.

We assume that *Ths97* could be considered as an hyper(myc)parasite for *F. solani* *Fso14*. Because the *Fusarium* rot on Olive trees is an increasing economic problem in Tunisian Olive lands *Ths97* abilities would respond perfectly to concerns of a modern agronomical approach.

This study provides the foundations to explore *Ths97* beneficial features for controlling the *Fusarium* rots on Olive. However, further studies on the interactions between Olive roots, the phytopathogen *F. solani* and the beneficial agent *T. harzianum* *Ths97* are needed to thoroughly understand the underpinning physiological processes highlighted herein.

Listes des publications

14th International Trichoderma and Gliocladium Workshop.

Nagpur India, du 27 au 30 Novembre 2016.

Organisateurs : Dr. Dan Funk Jensen, Dr. B.T.Raut, Dr. Pratibha Sharma, Dr. R.M. Grade.

Présentation affichée

Use of *Trichoderma harzanium* as potential biocontrol agent against the *Fusarium* root rot disease on olive trees

BEN AMIRA Maroua^{1,2}, RIBEIRO Sebastien¹, LOPEZ David¹, KHOUAJA Ali³, CHAAR Hatem³, TRIKI Mohamed Ali⁴, JULIEN Jean-Louis¹, PUJADE-RENAUD Valérie^{1,5}, AUGUIN Daniel⁶, VENISSE Jean-Stéphane¹

¹UCA, UMR PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

²Science Faculty of Bizerte, Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka, Tunisia;

³National Agronomic Institute of Tunis, INAT (Tunisia)

⁴Institut de l'Olivier, Université de Sfax, Tunisia;

⁵CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

⁶Université d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, INRA-USC1328, F-45067 Orléans, France.

Abstract:

Olive is a major agronomic species in Tunisia. It is attacked by various cryptogamic diseases such as the "fusarium Root Rot" with dieback symptoms caused by *Fusarium solani*. This disease is controlled by pesticides, resulting in possible collateral damages for environment and consumers. The use of *Trichoderma* species as biological control agents is definitively established. Because these fungi act by direct control on phytopathogens (mycoparasitism) and/or by potentiation of plant immunity, they potentially become an opportune alternative for the protection of olive plantations. The objective of our work was to analyze the biocontrol behavior provided by *T. harzanium* (Ths97) on olive trees against *F. solani* (Fso14). Thus, mycoparasitism activity on *Fusarium* (*in planta* and *in vitro*), and its ability to modulate in roots different plant defenses (PR proteins, phenylpropanoïd and oxidative pathways) were explored. Results show that *Trichoderma* stopped *in vitro* the *F. solani* growth. Optical microscopic analysis at contact zones showed that *Trichoderma* grew alongside *Fusarium* with numerous points of contact. Plus, numerous helicoidal structures of *Trichoderma* around *Fusarium* ("coiling") were observable. On olive trees, *Trichoderma* developed a substantial protective role against root *Fusarium* infestation, whether it was inoculated before or after a *Fusarium* infestation. Lastly, whereas *Fusarium* suppressed several plant defenses, *Trichoderma* exhibited no modulation or slight induction of plant defenses. Interestingly, when *Trichoderma* was co-inoculated with *Fusarium*, several plant defenses were highly up-regulated. These promising results provide valuable information for the use of *T. harzanium* (Ths97) as biocontrol agent against the fusarium Root Rot disease on olive.

Listes des publications

63rd Annual conference on Soliborne Plant Pathogens.

Davis USA, 28-30 mars 2017.

Organisateur : Dr. Kelly IVORS.

Présentation orale

***Fusarium* root rot controlled by *Trichoderma harzianum* on olive trees**

Maroua BEN AMIRA^{1,2,3}, Mohamed Ali TRIKI⁴, David LOPEZ¹, Ali KHOUAJA⁵, Hatem CHAAR⁵, Valérie PUJADE-RENAUD^{1,6}, Jean-Louis JULIEN¹, Jean Stéphane VENISSE¹

¹Université Clermont Auvergne, PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand (France)

²Science Faculty of Bizerte, Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka (Tunisia)

³Sylvo-Pastoral Institute, Sylvo-Pastoral Ressources Laboratory, Tabarka (Tunisia)

⁴Olive Institute, University of Sfax (Tunisia)

⁵National Agronomic Institute of Tunis, INAT (Tunisia)

⁶CIRAD, UMR-AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand (France)

Abstract:

Soil borne fungal pathogens are frequently found on cultivated plants and include *Fusarium* species which causes great financial loss in many agricultural areas in Tunisia, especially olive tree plantations. In this study, we were interested in the *Fusarium solani* strain *Fso14* that was isolated from the soil of a Tunisian olive tree plantation and that is the causative agent of “fusarium root rot” disease. Pesticides are still the main method of controlling this disease, even though they are known to damage both the environment and consumer health. Using the *Trichoderma* species as biocontrol agents (or BCAs) due to their ability to express antagonist activity against a large array of phytopathogens could be a worthwhile alternative. To date, the antagonist behavior of the *Trichoderma* genus on olive tree phytopathogens such as *Fusarium* is unknown. The objectives of our study were to test the antagonist activity of a strain of *T. harzianum* (*Ths97*, also isolated from Tunisian soil) on *Fso14* (*in planta* and *in vitro*), and to monitor the ability of *Ths97* to modulate different root defenses (PR proteins, phenylpropanoïd and oxidative pathways). Results showed that *Ths97* actively stopped *in vitro* *Fso14* growth, and optical microscopy confirmed *Ths97* mycoparasitic activity on *Fso14*, including several helicoidal structures between mycelia and collapses of several *Fso14* septa. On olive trees, *Ths97* developed a substantial protective role against *Fusarium* root infestation. This “bioprotective” event correlated with the up-regulation of several plant defenses by *Ths97*. These promising results provide valuable information for using *Ths97* as a biocontrol agent against fusarium root rot disease on olive trees.

Listes des publications

Magazine Auvergne sciences.

Article de vulgarisation 19/10/2016.

<http://www.auvergnesciences.com/>

<http://www.auvergnesciences.com/blog/2016/10/19/trichoderma-agent-biocontrole-contrefusariose-chez-lolivier/>

Trichoderma, agent de biocontrôle contre la fusariose chez l'olivier

Ben Amira M¹², **TRIKI MA**³, **KHAOUJA A**⁴, **CHAAR H**⁴, **JULIEN JL**¹, **PUJADE-RENAUD V**⁵, **AUGUIN D**⁶, **VENISSE JS**¹.

¹UCA, INRA, UMR PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

²Science Faculty of Bizerte, Sylvo-Pastoral Laboratory of Tabarka, Tunisia;

³Olive Institute, University of Sfax (Tunisia)

⁴National Agronomic Institute of Tunis, INAT (Tunisia)

⁵CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

⁶Université d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, INRA-USC1328, F-45067 Orléans, France.

La "pourriture fusarienne" ou "fusariose" est une maladie cryptogamique* grave causée chez l'olivier (*Olea europaea*) par le champignon phytopathogène* Deutéromycète *Fusarium solani*. Cette maladie se manifeste non seulement par le flétrissement de tout ou partie de l'arbre, mais peut rapidement entraîner sa mort. Elle sévit sur tout le pourtour méditerranéen, et récemment, une nouvelle souche pathogène nommée *Fusarium solani Fso14* a été isolée dans le sol d'une plantation d'oliviers en Tunisie préoccupant les professionnels de la filière oléicole. Le contrôle de cette maladie reste principalement basé sur l'utilisation de produits chimiques (*i.e.* les pesticides). Environ une trentaine de molécules sont préconisées en oléiculture par le réseau des Instituts Techniques Agricoles ACTA, dont les plus utilisées sont les pesticides organophosphorés et les pyréthrinoides. Bien que dirigés contre les bioagresseurs, ces pesticides sont pulvérisés sur un maximum de surface des parties aériennes de la plante, lieu de développement des olives qui seront récoltées pour leur consommation mais surtout pour la fabrication de l'huile. L'huile d'olive vierge est considérée comme un produit fragile vis-à-vis du risque d'éventuelles contaminations, car elle ne subit pas de purification supplémentaire au contraire des huiles de tournesol et de colza qui sont raffinées. Par conséquent, de nombreux résidus de pesticides y sont retrouvés et inévitablement consommés. Etant donné la toxicité de ces résidus avérée tant pour l'environnement que pour le consommateur et que leurs applications soient strictement réglementées, et du fait d'une consommation en huile d'olive vierge toujours croissante, une attention toute particulière est apportée aux problèmes de sécurité alimentaire posés par ces contaminants ce qui participe à la protection de l'image de marque mondialement acceptée de ce produit séculaire. Un moyen de lutte alternatif à l'emploi des pesticides est le biocontrôle*. Opérationnelle depuis plusieurs décennies, cette lutte a prouvé son efficacité dans le contrôle durable de nombreux ravageurs. De plus, en raison des préoccupations environnementales et sociétales actuelles, cette lutte alternative entre dorénavant dans une nouvelle dynamique. Le biocontrôle peut impliquer l'emploi de souches fongiques, et certaines espèces appartenant au genre *Trichoderma* sont utilisées depuis longtemps en lutte biologique en raison de leur pouvoir mycoparasitaire*. En effet, ces souches présentent la particularité d'exprimer un comportement parasitaire dirigé spécifiquement vers d'autres champignons, c'est à dire sans être nuisible pour la plante. Bien au contraire, pour celle-ci, la présence de ces champignons salvateurs peut renforcer son immunité de base en lui provoquant l'accumulation de tout un arsenal de molécules défensives destiné à éradiquer ses bioagresseurs infectieux. A bien des égards, l'emploi de ces souches fongiques répond

Listes des publications

pleinement et stratégiquement à l'évolution nécessaire des systèmes de production agricoles actuels (hérités de la dernière phase de modernisation de l'agriculture) afin de répondre aux nombreux défis qui vont structurer l'agriculture de demain.

Objectif - Notre étude s'inscrit dans un double axe. Dans le premier axe, nous avons évalué l'activité mycoparasitaire de *Trichoderma* vis-à-vis de cette nouvelle souche virulente de *Fusarium solani*. Cette évaluation a été réalisée en inoculant les protagonistes ensemble sur des jeunes plants d'oliviers cultivés sous serre (espèce Chemlali, reconnue pour ses performances à produire des fruits et des huiles de hautes qualités mais très sensible à l'agent de la fusariose), ou en les cultivant ensemble en culture *in vitro**. Dans le second axe, nous avons exploré les dialogues moléculaires déployés par les protagonistes durant leur confrontation physique. En effet, derrière nombre d'interactions entre deux êtres vivants se cachent des questions exclusivement nutritionnelles ; le parasitisme intègre cette relation, et ce dans un contexte purement unilatéral. De même, *Trichoderma* applique un mode de régime alimentaire particulier, l'absorbotrophie*. Afin de se nourrir, il sécrète à l'extérieur de son organisme un large panel d'enzymes digestives qui assureront une digestion extracellulaire (ou exodigestion). Cette première étape est suivie de l'importation par absorption des petites molécules dissoutes à travers les membranes biologiques. De part la nature biochimique de ces membranes qui les rend quasi-imperméables à la plupart de ces molécules dissoutes, l'absorption se réalisera alors au travers de canaux transmembranaires spécifiques tels les Major Intrinsic Proteins (ou MIPs). Ainsi, ce second axe nous permet de mieux comprendre cette famille protéique dont le rôle chez les champignons reste encore énigmatique, et de caractériser leur profil d'expression dans un contexte mycoparasitaire.

Axe 1 - *Trichoderma harzianum* exerce une activité inhibitrice très significative sur le développement de *Fusarium solani* Fso14.

Fusarium solani induit des symptômes morbides très sévères sur les jeunes plants d'olivier (pourritures racinaires et flétrissements foliaires irréversibles). Les plants meurent au bout de 4 à 5 semaines d'infestation. Un traitement des plants avec *Trichoderma*, qu'il soit préventif (avant application de l'agent de la fusariose) ou curatif (plusieurs jours après le début de l'infestation) offre une protection substantielle à ces jeunes plants. En effet, aucun développement de symptômes de fusariose n'est à diagnostiquer. La manière dont *Trichoderma* empêche *Fusarium* d'exprimer son pouvoir pathogène sur sa plante hôte olivier reste à déterminer. Cependant, les tests *in vitro* nous ont permis de mettre en lumière quelques faisceaux d'indices très intéressants. *Trichoderma* présente une dynamique de croissance plus rapide que *Fusarium*, lui permettant d'être plus compétitif spatialement notamment pour l'appropriation des nutriments. De même, *Trichoderma* exprimerait un comportement mycoparasitaire directe sur *Fusarium*. En effet, lorsque les deux champignons se développent sur un même milieu de culture, un prélèvement de mycélium au niveau de la zone de confrontation montre que les filaments de *Trichoderma* s'imbriquent parmi ceux de *Fusarium* avec de nombreux événements d'accolements et d'enroulement. De même, de fins prolongements mycéliens de *Trichoderma* se terminant par des papilles adsorbées sur les filaments de *Fusarium* ont été observés. Ces structures entre mycélia sont considérées comme des caractéristiques comportementales typiques d'un acte de mycoparasitisme : *Trichoderma* rentre en contact physique avec *Fusarium* afin d'en soutirer les nutriments nécessaires à sa vie. En conséquence de quoi, *Fusarium* présente un développement définitivement stoppé.

Axe 2 - *Trichoderma harzianum* présente huit Major Intrinsic Proteins (MIP).

Plusieurs génomes de *Trichoderma* sont séquencés -dont celui de *Trichoderma harzianum*- et les données sont rendues publiques. L'exploration du génome de *Trichoderma harzianum* a permis d'identifier 8 membres MIP. L'étude phylogénétique des séquences protéiques correspondantes classerait les MIP en 4 aquaglycéroporines (AQGP), 3 aquaporines (AQP) et 1 X-Intrinsic protéine (XIP). Ces MIP sont qualifiées de super-famille protéique et sont partagées par la plupart des organismes vivants sur terre. Bien que les MIP soient subdivisées en peu de sous-familles partageant la même nomenclature, il n'en reste

Listes des publications

pas moins que les séquences protéiques restent très diversifiées. Chez *Trichoderma*, la séquence XIP attire particulièrement notre attention car elle est le seul membre partagé avec les plantes, et ses rôles fonctionnels dans la biologie des organismes restent totalement inconnus. Sur les 8 MIP de *Trichoderma*, 2 AQP, 1 AQP et la XIP montrent des modulations de transcription significatives au cours de la confrontation entre *Trichoderma harzianum* et *Fusarium solani*. Nous émettons l'hypothèse que les MIP, à l'instar d'autres familles de permeases et de par leurs fonctions putatives de transporteur transmembranaires de petites molécules dissoutes, pourraient être impliquées dans les activités mycoparasitaires exprimées par *Trichoderma harzianum*.

Bilan - Ces résultats préliminaires fournissent des informations très précieuses, tant sur les potentialités phytoprotectrices de *Trichoderma* sur *Fusarium solani*, l'agent de la fusariose de l'Olivier, que sur les dialogues moléculaires qui unissent ces agents fongiques lors de leur confrontation physique. De même, ces travaux ont permis de mettre en exergue pour la première fois la diversité des MIP dans des organismes fongiques parasites, en l'occurrence *Trichoderma*, ainsi que la modulation de leur expression transcriptionnelle au cours d'une interaction mycoparasitaire. Une connaissance plus approfondie de l'action des souches phytoprotectrices de *Trichoderma* ainsi que le rôle de ses molécules induites lors de déploiement de ses différentes activités cellulaires (dont celle de mycoparasitisme) participeront à optimiser les moyens de lutte par biocontrôle de nombreuses maladies cryptogamiques chez l'olivier.

Quelques mots clés et leurs définitions:

Une maladie cryptogamique est une maladie causée par un champignon parasite.

Le biocontrôle est un ensemble de méthodes de protection sanitaire des cultures basé sur le recours à des organismes vivants ou des substances naturelles issues de ces organismes vivants, mais sans dangerosité pour les cultures.

Un agent phytopathogène est un organisme parasite vivant au dépend d'une plante, ici *Fusarium solani* Fso14 sur l'Olivier.

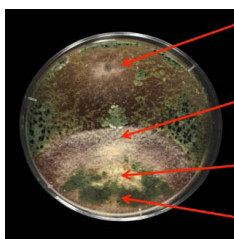
Le mycoparasitaire décrit une relation parasitaire entre deux champignons. Elle se manifeste par un contact entre les organismes dont l'un vit aux dépens de l'autre.

L'absorbotrophie est une forme de régime alimentaire où l'organisme se nourrit en absorbant les nutriments à travers sa membrane plasmiques.

Les MIP, pour Major Intrinsic Proteins, correspondent à une super-famille de protéines transmembranaires. Grâce à leur structure tridimensionnelle en forme de canal, elles facilitent la circulation de l'eau et de plusieurs petits solutés organiques et inorganiques solubles au travers les membranes biologiques.



Symptômes de fusariose (flétrissement) sur Olivier



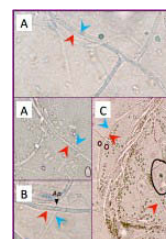
Co-développement de *Trichoderma* avec *Fusarium*

Trichoderma harzianum (>)

Zone de confrontation *Trichoderma harzianum*/*Fusarium solani*

Zone de chevauchement de *Trichoderma harzianum*

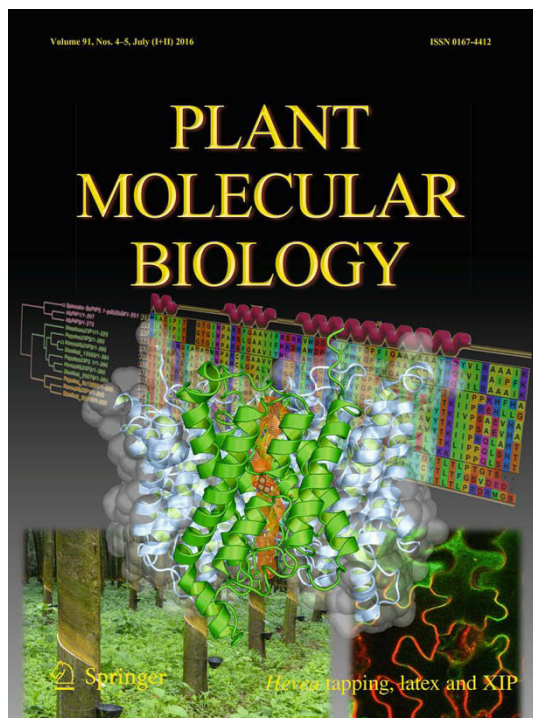
Fusarium solani (>)



Imbrication des mycéliums de *Trichoderma* (>) avec *Fusarium* (>)

Article accepté dans Plant Molecular Biology

Plant Mol Biol (2016) 91:375-396
DOI 10.1007/s11103-016-0462-y



The *Hevea brasiliensis* XIP aquaporin subfamily: Genomic, structural and functional characterizations with relevance to intensive latex harvesting

David Lopez¹, **Maroua Ben Amira**¹, Daniel Brown^{2,7}, Beatriz Muries³, Nicole Brunel-Michac¹, Sylvain Bourgerie⁴, Benoit Porcheron⁵, Remi Lemoine⁵, Hervé Chrestin⁶, Ewan Mollison⁷, Alessandra Di Cola⁷, Lorenzo Frigerio², Jean-Louis Julien¹, Aurélie Gousset-Dupont¹, Boris Fumanal¹, Philippe Label¹, Valérie Pujade-Renaud^{1,8}, Daniel Auguin^{4*}, Jean-Stéphane Venisse^{1*}

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, INRA, UMR 547 PIAF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

²School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, United Kingdom;

³Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium;

⁴Université d'Orléans, **Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207**, INRA-USC1328, F-45067 Orléans, France;

⁵Equipe SEVE, UMR 7267 CNRS/Université de Poitiers, Ecologie, Biologie des Interactions, Bâtiment B31, TSA 51106, 86073 Poitiers CEDEX 9, France;

⁶Institut de Recherche pour le Développement, UR060/CEFE-CNRS, 1029 route de Mende, 34032 Montpellier, France;

⁷Biotechnology Unit, Tun Abdul Razak Research Centre, Brickendonbury, Hertford, United Kingdom;

⁸CIRAD, UMR AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

The *Hevea brasiliensis* XIP aquaporin subfamily: genomic, structural and functional characterizations with relevance to intensive latex harvesting

David Lopez¹ · Maroua Ben Amira¹ · Daniel Brown^{2,7} · Beatriz Muries³ · Nicole Brunel-Michac¹ · Sylvain Bourgerie⁴ · Benoit Porcheron⁵ · Remi Lemoine⁵ · Hervé Chrestin⁶ · Ewan Mollison⁷ · Alessandra Di Cola⁷ · Lorenzo Frigerio² · Jean-Louis Julien¹ · Aurélie Gousset-Dupont¹ · Boris Fumanal¹ · Philippe Label¹ · Valérie Pujade-Renaud^{1,8} · Daniel Auguin⁴ · Jean-Stéphane Venisse^{1,9}

Received: 14 October 2015 / Accepted: 25 February 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract X-Intrinsic Proteins (XIP) were recently identified in a narrow range of plants as a full clade within the aquaporins. These channels reportedly facilitate the transport of a wide range of hydrophobic solutes. The functional roles of XIP *in planta* remain poorly identified. In this study, we found three XIP genes (*HbXIP1;1*, *HbXIP2;1* and *HbXIP3;1*) in the *Hevea brasiliensis* genome. Comprehensive bioinformatics, biochemical and structural analyses were used to acquire a better understanding of this AQP subfamily. Phylogenetic analysis revealed that *HbXIPs* clustered into two major groups, each distributed in a specific lineage of the order Malpighiales. Tissue-specific expression profiles showed that only *HbXIP2;1* was expressed in all the vegetative tissues tested (leaves, stem, bark, xylem and latex), suggesting that *HbXIP2;1* could take part in a wide range of cellular processes. This is particularly relevant to the rubber-producing laticiferous

system, where this isoform was found to be up-regulated during tapping and ethylene treatments. Furthermore, the XIP transcriptional pattern is significantly correlated to latex production level. Structural comparison with *SoPIP2;1* from *Spinacia oleracea* species provides new insights into the possible role of structural checkpoints by which *HbXIP2;1* ensures glycerol transfer across the membrane. From these results, we discuss the physiological involvement of glycerol and *HbXIP2;1* in water homeostasis and carbon stream of challenged laticifers. The characterization of *HbXIP2;1* during rubber tree tapping lends new insights into molecular and physiological response processes of laticifer metabolism in the context of latex exploitation.

Keywords XIP aquaporin · *Hevea brasiliensis* · Latex · Evolution · Glycerol · Cell homeostasis

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11103-016-0462-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Daniel Auguin
auguin@univ-orleans.fr

✉ Jean-Stéphane Venisse
j-stephane.venisse@univ-bpclermont.fr

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, INRA, UMR 547 PIAF, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

² School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, UK

³ Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

⁴ Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, UPRES EA 1207, INRA-USC1328, 45067 Orléans, France

⁵ Ecologie, Biologie des Interactions, Equipe SEVE, UMR 7267 CNRS/Université de Poitiers, Bâtiment B31, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

⁶ Institut de Recherche pour le Développement, UR060/CEFE-CNRS, 1029 route de Mende, 34032 Montpellier, France

⁷ Biotechnology Unit, Tun Abdul Razak Research Centre, Brickendonbury, Hertford, UK

⁸ CIRAD, UMR AGAP, 63000 Clermont-Ferrand, France

⁹ Campus Universitaire des Cégeaux, 8 Avenue Blaise Pascal, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

Introduction

Of all the rubber-producing plants of substantial economic value, *Hevea brasiliensis* remains the world's sole commercial source of natural rubber thanks to its high yields and ease of harvest. Natural rubber, which consists mainly of *cis*-1,4-polyisoprene biopolymer, is highly valued due to its unrivalled biochemical and physical properties (Cornish 2001). Rubber biosynthesis occurs in latex, the milky cytoplasm of laticifers, highly specialized anastomosed cells forming a distinct network in the phloem tissues of the rubber tree (Hagel et al. 2008). Latex is harvested by a process known as tapping, which consists of regularly incising the trunk bark to cut through the laticifer network. This allows latex to flow out through the wound to be collected and later processed into natural rubber. Tapping is repeated regularly, so an important limiting factor of natural rubber yield is latex regeneration. Regeneration relies on both complex rubber biosynthesis pathways in laticifers, and on water and various organic sources such as sucrose and nitrogen supplied to these cells by the surrounding parenchyma (Tungngoen et al. 2009). The biological mechanisms underlying the latex biosynthesis pathways and the artificial outflow of latex from injured trunks (both qualitatively and quantitatively) are not yet fully understood. However, the global economic importance of natural rubber justifies thorough investigation of these physiological processes.

Ethylene pretreatments (using the ethylene releaser Ethrel[®]) are commonly used to ease latex flow and stimulate the regeneration metabolism, allowing higher yields of latex production (Coupé and Chrestin 1989; Zhu and Zhang 2009). However, both ethylene pretreatments and repeated tapping are liable to affect ionic and water homeostasis, causing the depletion of organic resources, and potentially undermining the integrity of the exploited trees (d'Auzac et al. 1997). Molecular homeostasis is the process by which cells regulate vital parameters, i.e. turgor, fluid balance, pH and energy levels. As part of the water homeostasis process, the concentrations of various solutes (or osmolytes/electrolytes) are co-regulated. Osmolytes help to ensure the maintenance and recovery of vital homeostasis conditions (Parida and Das 2005). In particular, specific osmolytes such as sugars and sugar alcohols (cyclic or acyclic) may be diverted from the overall carbon metabolism to participate in these homeostatic adjustments (Hare et al. 1998). Sucrose loading of laticifers is an extremely important process, as it supplies the acetate pool, which provides the energy for the cell to function properly, and which is crucial for *H. brasiliensis* as it initiates the biosynthesis of isoprene chains and thereby rubber biosynthesis (Dusotoit-Coucaud et al. 2009; Chow et al.

2007, 2012). Some latex carbohydrates are thought to act as protective osmolytes but this has not yet been demonstrated (Dusotoit-Coucaud et al. 2010b). Glycerol, identified as an essential osmolyte for yeast, bacteria and animals, may be one candidate. Information on its protective role in plants remains scant (George et al. 2011; Hasegawa et al. 2000; Eastmond 2004), although some dedicated channels (aquaglyceroporins or aquaporins) have been well documented (Zardoya et al. 2002). There is no information on the presence and putative osmotic regulating role of glycerol in latex-producing plants. It is thus of interest to characterize the molecular players in water and organic solute transport, notably glycerol, which is involved in global cell homeostasis maintenance, and aquaglyceroporins (or aquaporins, AQP) which are likely candidates for adjusting hydric and electrolyte status, since both water and glycerol are transported by these channels.

Aquaporins are integral membrane proteins of the Major Intrinsic Protein (MIP) multigene family. They are specialized channel proteins that allow rapid selective transport of water and diverse small neutral solutes across the lipid bilayer (Li et al. 2013; Chaumont and Tyerman 2014). They are ubiquitous in all living systems, consistent with their fundamental role of homeostasis. In plants, AQPs are remarkably diverse. Their classification, based on their sequence comparison and sub-cellular localization, is well established. Typically, AQP are clustered into seven subfamilies (Anderberg et al. 2012). One of these recently characterized subfamilies is designated X-Intrinsic Protein (XIP) (Danielson and Johanson 2008). The presence of XIP appears to be shared by a narrow range of living organisms including protozoa, fungi, and some non-vascular and vascular *Viridiplantae* (Danielson and Johanson 2008; Gupta and Sankaramakrishnan 2009; Lopez et al. 2012). Although XIPs show sequence differences from other MIPs, overall their structure remains highly conserved. Like MIPs, they are composed of six transmembrane helices (TMH1-6) connected by five loops (LA-E), and two membrane-embedded short half-helices facing each other named hemipore-1 (TMH1-3, LA-C) and -2 (TMH4-6, LD-E). These hemipores are buried inside the membrane and virtually constitute a seventh helix added to the above 6 TMH bundle. Each contains the conserved MIP asparagine-proline-alanine (NPA) signature sequence. These motifs are embedded in the lipid bilayer and form a narrow hydrophilic path (Murata et al. 2000). Each hemipore is contiguous with N- and C-terminal ends facing the cytoplasmic side of the membrane. As usually observed in most plant AQPs, these helix-helix interface regions show small weakly polar amino acid residues (Wallace and Roberts 2004). A second feature in common with MIPs is the aromatic/

arginine (ar/R) constriction region composed of four amino acid residues (R1-R4) found in TMH2 (R1), TMH5 (R2), and loop E (R3 and R4), which forms a selectivity filter contributing to a size exclusion barrier and a hydrogen bond acceptor and donor continuum needed for the efficient transport of substrates (Murata et al. 2000). At present, the few biological functions clearly assigned to XIP remain hypothetical (Bienert et al. 2011; Lopez et al. 2012; Park et al. 2010; Giovanetti et al. 2012; Zhang et al. 2013; Reuscher et al. 2013; Venkatesh et al. 2013; Yue et al. 2014; de Paula Santos Martins et al. 2015). However, the fact that tobacco *NtXIP1;1* appears to be located at the plasma membrane of epidermal and parenchyma cells (Bienert et al. 2011), together with its putative function of allowing the diffusion of certain polar solutes across the membrane suggests that XIP may represent significant cellular checkpoints (like other MIP) for controlling cellular permeability and osmolarity.

Research programs studying the characterization of metabolic pathways responsible for latex biosynthesis, outflow and regeneration, especially in the case of ethylene-stimulated latex production, are rapidly expanding (Chow et al. 2007; Tang et al. 2013; Chao et al. 2015; Wei et al. 2015; An et al. 2015). One of the major topics is ethylene-stimulated latex production and the study of various trans-membrane transporter families. In the latter field, it was shown that the expression of AQP *HbPIP2 s* and *HbTIP1;1* (Tungngoen et al. 2009, 2011; An et al. 2015) and of the sucrose transporters *HbSUT1B* (= *HbSUT3*) and *HbPLT2* (Dusotoit-Coucaud et al. 2010a, b; Tang et al. 2010) were stimulated in the latex following ethylene treatments correlating with yield increase. Since ethylene tends to induce a concomitant dilution of latex, the hydric homeostasis of the laticifers in and near the tapping cut is severely challenged.

The aim of this study was first to investigate the composition of the whole XIP subfamily in *H. brasiliensis* in terms of protein structure, subcellular localization and functional properties, the latter by testing the ability of some of its members to enable water and glycerol to diffuse. In the context of rubber tree production, we focused on the stress-induced XIP isoform, *HbXIP2;1*. We then characterized its contribution to the molecular response during ethylene stimulation and tapping of *H. brasiliensis*, to assess its potential role in the regulation of glycerol and water homeostasis in the physiological context of intensive latex production. Lastly, we discuss our findings with a special focus on glycerol and its potential role as a general stress osmo-protectant and organic source of carbon, and then on the physiological significance of aquaporin permeability to glycerol, which remains poorly understood *in planta*.

Materials and methods

Plant material

Plant material used for monitoring the modulated XIP expression in challenged trees came from field experiments carried out at the Bongo/SAPH plantation (Ivory Coast) (Dusotoit-Coucaud et al. 2010b). Latex and bark samples were collected from trunks of 2 independent mature PB217 rubber trees (10 years old), industrially harvested for 2 years. Trees had been regularly tapped (three times per week) without Ethrel[®] stimulation for 3 months and left untapped for 1 week before Ethrel[®] treatment and the first sample collection. The latex samples were collected as described by Pujade-Renaud et al. (1994). Plant material used for monitoring the constitutive XIP expression in various vegetative organs came from 3 independent untapped PB217 rubber trees (6 years old) grown in a controlled-environment greenhouse (Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France) under a 16 h light/8 h dark photoperiod, at 18/22 °C (night/day), with a relative humidity set at 80 ± 10 %.

Genomic DNA extraction, amplification PCR and cloning

XIP genomic sequences from *H. brasiliensis* (PB217) were cloned by PCR with degenerate primers and RACE methods, according to manufacturer's protocols (Invitrogen, Carlsbad, USA). Genomic DNA was extracted from 0.25 g of leaves using the CTAB method (Doyle and Doyle 1987). The 500 bp up- and downstream proximal non-coding regions from the start and stop codons for each *HbXIP* gene were targeted using the primer sets detailed in Supplementary Tab S2. Primers were designed from XIP sequences identified from the *H. brasiliensis* unpublished genome sequence information (TARRC). PCR was performed using 0.5U of platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Saint Aubin, France), and amplicons were cloned into the *pGEM*[®]-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA), and sequenced on both strands.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA from latex and bark sampled from plantation trees were obtained by Dusotoit-Coucaud et al. (2010a). Real-time PCR was performed using a MyiQ instrument (Bio-Rad) with MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec) containing 2 µl of 20-fold diluted cDNA. Calculations of the differential accumulation of genes in response to stress (standardized with unstressed samples at t_0) were carried out with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equation according to

Pfaffl's procedure (2001). Constitutive assessment of gene expression between vegetative organs was plotted on a percentage scale. In our experimental conditions, the arbitrary value of 100 corresponds to a C_t value of 19, the highest gene expression level in *H. brasiliensis*; the arbitrary value of 0 is related to C_t corresponds to a C_t value of 37, a non-accumulation of transcript. PCR efficiency was $100 \pm 3\%$ for all primer pairs. Primer specificity and amplification efficiency were verified for each gene by both melting curve analysis (after 40 cycles) and TAE/2% agarose gel electrophoresis. Normalization of the target gene expression was achieved using three housekeeping genes (*HbAct*, *HbCYP* and *HbUBQ*) chosen from a panel of widely used housekeeping genes (Li et al. 2011) using the software application BestKeeper v1 (Pfaffl et al. 2004). These genes were chosen from different protein families in order to reduce the risk of co-regulations. All the primers used for this study were designed with the Primer3plus application (Untergasser et al. 2007) and detailed in Supplementary Tab S2. qPCR analyses were carried out in triplicate from each biological samples. For statistical analysis, aquaporin steady-state gene expression levels were computed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's honest significant difference (HSD) post hoc test ($p < 0.001$).

In silico bioinformatics analysis

The *Hevea* XIP subfamily was explored in silico using described heterologous XIP sequences (Lopez et al. 2012) as initial queries. tBLASTn (Altschul et al. 1997) was used against several genome resources: the non-redundant generalist databases National Center for Biotechnology information (NCBI) and the *Hevea* genomic databank generated from *H. brasiliensis* clone RRIM 928 provided by the TARRC (Tun Abdul Razak Research Centre, Hertford, United Kingdom, <http://www.tarrc.co.uk>). *Viridiplantae* XIP sequences were retrieved from NCBI and Phytozome portals from different plant species: two basal embryophyte phyla with the lycophyte *Selaginella moellendorffii* and the avascular bryophyte *Physcomitrella patens*, a basal eudicot phylum with the Ranunculales *Aquilegia cærulea*, and several core eudicot phyla with a selection of rosoid and asterid species. Special attention was paid to the rosoid phylum (with APG III as repository; Chase and Reveal 2009), for which a maximum number of Malpighiales XIP sequences were collected (Supplementary Tab S1). Percentages of amino acid similarity and identity were calculated using the BLAST algorithm. The unrooted phylogenetic tree was constructed with 61 protein sequences using the maximum likelihood method implemented in the PhyML program v3.0 (Guindon and Gascuel 2003). The maximum likelihood analyses were performed

with the Jones–Taylor–Thornton evolutionary model using 1000 bootstrap replicates to assess the reliability for degree of support for each internal branch on the phylogenetic trees. Trees were viewed and edited with TreeDyn (Chevenet et al. 2006), and bootstrap values $< 60\%$ were discarded. The data for the three XIP sequences mentioned for this work can be found in the GenBank data library under the accession numbers KT071670 (*HbXIP1;1*), KT071669 (*HbXIP2;1*) and KT071668 (*HbXIP3;1*). All accession numbers for sequence dataset reported herein are listed in Supplementary Tab S1.

XIP structure modeling

HbXIP2;1 models were obtained using a standalone version of the I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement) program suite (V3) (Zhang 2008; Roy et al. 2010; Yang et al. 2015). Tetramer modeling consisted of a superimposition of four monomers on a tetramer template structure (pdb code 2b5f) followed (to remove any possible intermolecular bump) by a single minimization stage diverting the CHARMM-GUI online input generator program from its original aim (Jo et al. 2008; Brooks et al. 2009). Alternate conformations for loop D that suited tetramer formation by clearing off the required interface were previously found using modeller 9.13 (Webb and Sali 2014) as embedded in UCSF Chimera macrocommand 'refine loops' (Yang et al. 2012). The MOLE 2.0 program (Sehnel et al. 2013) was used to delineate, and characterize in terms of physico-chemical properties the channels along the aquaporin structures. The glycerol molecule was placed according to the I-TASSER binding site prediction. APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) (Baker et al. 2001) was used with the PARSE forcefield (Tang et al. 2007) on PDB2PQR generated files (Dolinsky et al. 2007) out of the submitted coordinates to calculate the electrostatic potentials. PyMOL (DeLano 2004) was used to analyze and illustrate the molecular structures and models.

Yeast expression for monitoring of water and glycerol transport assays

Transcripts of *HbXIP2;1* and *PtPIP2;8* as positive control of water transporter (*P. trichocarpa*, Potri.005G109300) were cloned in *pYX212* (specific PCR primers detailed Supplementary Tab S2). For water measurement assays, transfected yeast strains were grown on synthetic minimal medium (uracil-deficient SC medium) supplemented with glucose, at 30 °C overnight. For the yeast labeling and fluorescent experiments, transfected yeast cells were previously loaded for 30 min at room temperature with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidylester (CFSE; Sigma, France) (40 μ M in buffer A: Tris–HCl 50 mM pH

8.0, 0.5 M NaCl). A simplified technique was used to monitor cell volume changes induced by osmotic shocks, as described by Soveral et al. (2007). Experiments were performed on a POLARstar Omega fluorimeter (BMG Labtech, France). In each assays 50 μ L of labeled cells was mixed with an equal volume of hypo- (buffer A) or iso-osmotic (buffer A without NaCl) solutions. Four runs were done. Following optimization, the increased fluorescence intensities of the intact cells were recorded at 0.2 s. Results were expressed as a percentage increase compared with measured fluorescence at t_0 (i.e. before osmotic shock) and set at 100 %. For the glycerol transport assays, the yeast strain JT4014 (*fps1::leu2* in JT100) kindly provided by Dr. J. Thevelein (Katholieke Universiteit Leuven, Belgium) was used. The ability of yeast strain to grow under osmotic stress (1 M sorbitol) was assessed on solid synthetic minimal medium supplied with 1 M sorbitol. After inoculation, plates were incubated for 5 days at 30 °C. Cell growth comparison, for the same dilution factor, revealed growth rate gain or loss. Radiolabeled glycerol uptake assays were performed by a modified method of Anderca et al. (2004). Yeast cells transfected with either empty (*pYX212*) or integrating *HbXIP2;1* gene (*pYX212-HbXIP2;1*) were cultivated in synthetic minimal medium. At t_0 , 100 μ L of cells in MES buffer was diluted with 100 μ L of MES buffer containing 2 mM [14 C]-glycerol (0.14 μ Ci). Assays were repeated three times. Results are expressed as difference in radioactivity measured between 10 min and 20 min of incubation.

Confocal microscopy

The cDNA encoding *HbXIP2;1* was fused to the 3' end of the cDNA of YFP (lacking its stop codon) by fusion PCR, resulting in a YFP-*HbXIP2;1* translational fusion. The fusion was inserted into the *XbaI*-*SacI* sites downstream of the CaMV 35S promoter of vector *pGREEN0029* (Hellens et al. 2000) using the primers listed in Supplementary Tab S2. The construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58 and used for agroinfiltration of leaf epidermal cells as described previously (Sparkes et al. 2006). After 3 day of incubation, leaf segments were incubated with 8 μ M FM4-64 for 10 min, and the abaxial epidermal cells visualized by confocal microscopy with a Leica TCS SP5 microscope (Leica, Germany). YFP was excited at 514 nm and detected in the range 525–550 nm, FM4-64 was excited at 514 nm and detected in the range 616–645-nm.

In situ hybridization

Fresh stems were harvested, cut and immediately fixed in FAA (3,7 % (v/v) formaldehyde, 50 % (v/v) ethanol, 5 %

(v/v) acetic acid) at 4 °C overnight. Fixed samples were dehydrated and progressively embedded in paraffin (Paraplast, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Brunel et al. 2002). Transversal section 10 μ m thick were cut with a rotary microtome (HM 340E, Microm International GmbH, Walldorf), mounted on Polysine slides (O. Kindler GmbH, Freiburg, Germany) and dried at 42 °C for 1 day for in situ mRNA localization according to Dusotoit-Coucaud et al. (2010a). Gene-specific RNA probes were designed to be located in the variable 3'UTR region of *HbXIP2;1* transcripts with an average size of 229 ribonucleotides (primers detailed in Supplementary Tab S2). DNA coding the probes were cloned in *pGEM*[®] T-Easy vector (Promega). Sense and antisense digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes were synthesized as described in Brunel et al. (2002). Stem sections were incubated overnight at 50 °C with 1.5 ng μ L⁻¹ of either sense or antisense probes and leaf sections with 3 ng μ L⁻¹. Digoxigenin-labeled probe was detected using anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich), followed by colorimetric detection of phosphatase activity using an AP conjugate substrate kit (Bio-rad Hercules, CA, USA). After suitable color development, the reaction was stopped by rinsing with water, and sections were dried and mounted in Eukitt (Euromedex, Mündelsheim, France). Observations were performed with an Axioplan 2 microscope (Zeiss, Jena, Germany). Data were recorded on a digital camera (AxioCam HR, Zeiss) using Axiovision digital imaging software.

Results and discussion

To date, among the few sequenced genomes of *H. brasiliensis* (Müll. Arg.), only one draft genome sequence has been published (Rahman et al. 2013). The sequence information used in this study was obtained from a second draft genome generated by the Malaysian Rubber Board (unpublished results). A first sequence dataset from this draft genome showed it to contain genes encoding the four orthodox subfamilies of aquaporins (PIP, TIP, NIP and SIP; unpublished results). A previous study of MIP from this species focusing on PIP and TIP subfamilies (Tungngoen et al. 2009) demonstrated their capacity to allow water diffusion across biological membranes, with mRNA expression patterns correlating with those of sucrose transporters. It was hypothesized that these proteins were key players in modulating the efficiency of latex outflow in mature rubber trees challenged by tapping and hormone treatment. Among these proteins, MIP may aid water circulation between latex cells and liber/xylem tissues inherent to a coordinated liber tissue turgor and an active sucrose mobilization (Dusotoit-Coucaud et al. 2010a, b;

Tungngoen et al. 2011). Here we show that *H. brasiliensis* possesses at least three MIP members belonging to the X-Intrinsic Proteins subfamily. Only one member appears to be transcribed, together with other PIP or sucrose transporters, with expression profiles correlating with the latex outflow from exploited rubber trees. This plant species and the particular physiological context lent by its growing and exploitation conditions thus offer an interesting and original viewpoint for further exploration of this XIP subfamily.

Isolation and bioinformatics analysis of three *Hevea brasiliensis* XIP members

HbXIP genes and protein analysis

A first full-length cDNA encoding an XIP gene was preliminarily isolated from *H. brasiliensis* leaf tissues, and named *HbXIP2;1* (KT071669), based on phylogenetic data (as explained below) and BLAST comparison with identified XIP from poplar. An analysis of the XIP subfamily across rosids plant species to show that several isoforms are usually present (Gupta and Sankararamakrishnan 2009; Lopez et al. 2012). However, searches in various expression datasets revealed that very few XIP members are expressed, in contrast to other MIP subfamilies in which most members are expressed, confirming an earlier evolutionary hypothesis of possible loss of expression/function for some XIP (Lopez et al. 2012; Venkatesh et al. 2015).

Two other partial *HbXIP* isoforms named *HbXIP1;1* (KT071670) and *HbXIP3;1* (KT071668) were cloned from *Hevea* genomic DNA using degenerate primers designed from highly conserved regions of XIP orthologs from *Malpighiales* (Supplementary Tab S1). *HbXIP1;1* and *HbXIP3;1* full-length sequences were completed from the *Hevea* genomic databank made available by the TARRC Institute. The proposed nomenclature for *HbXIP* sequences has been established based on the phylogenetic analyses (Fig. 1a) as previously proposed by Lopez et al. (2012) and in full accordance with the conventional MIP nomenclature (Johansson et al. 2001).

HbXIP(1-2-3);1 genes encode polypeptides of 289, 305 and 308 amino acids residues respectively (Fig. 1b; Supplementary Fig. S1). Predicted peptide sizes and molecular masses (Supplementary Fig. S2) are consistent with most reports on aquaporins, which generally range from 270 to 360 AA and 26 to 35 kD (Gomes et al. 2009). *HbXIP* share a similar exon–intron structure with their plant cognates from the same phylogenetic clade: *HbXIP1;1* presents two exons, and *HbXIP(2-3);1* three exons (Fig. 1b). All introns are systematically positioned upstream of the first transmembrane helix (TMH1), and exhibit the classic canonical

dinucleotides GT and AG for donor and acceptor splice sites. This exon/intron organization is shared by plants belonging to the same phylogenetic clade, as observed for each MIP subfamily (Johansson et al. 2001). Exons are conserved within each XIP sub-group (60–80 % similarity, Supplementary Fig. S2) in regard to introns that exhibit strong variability in lengths and nucleotide sequences (± 45 % similarity). Overall, the genomic architecture of the XIP subfamily appears to be conserved among most *Viridiplantae*, and could be considered *de facto* as a plant lineage specific profile.

HbXIP phylogenetic analysis

The unrooted tree confirmed that XIP clearly diverge from other MIP subfamilies (represented here by *HbPIP1;1* and *HbPIP2;1*, as outliers) (Fig. 1a). All the XIP members fall into three independent monophyletic master clusters. Cluster I groups orthologous members from moss and spikemoss, which are basal to all other XIP. Clusters II and III group all XIP from the Tracheobionta taxon. Cluster II includes sequences from the Rosanae taxon exclusively, and Cluster III encompasses sequences from the Rosanae and Asteridae taxons. These four branches present strong bootstrap supports of 100, 94, 89 and 97 %, respectively. The *HbXIPs* are integrated into polyphyletic groups belonging to Clusters II (for *HbXIP1;1*) and III (for *HbXIP2;1* and *HbXIP3;1*). Interestingly, *HbXIP2;1* and *HbXIP3;1* are clustered together in a distinct clade exclusive to the Rosanae phylum with a significant bootstrap support of 72 %. In Cluster III, XIP from asterid plant species form a specific clade (bootstrap support of 94 %). Finally, all identified *HbXIPs* share the shortest distance with the milky-sapped tropical shrub *Manihot esculenta*, another latex-producing *Euphorbiaceae* species. This is consistent with the eudicotyledonous placement of *Hevea* in the order Euphorbiales based on chloroplast gene phylogeny (Tangphatsornruang et al. 2011). The clade that includes *HbXIP2;1* includes XIP sequences from *Euphorbiaceae* only, such as *M. esculenta*, *Ricinus communis*, *Jatropha curcas*, *Plukenetia volubilis* and *Euphorbia esula*. Also, *HbXIPs* fall into distinct monophyletic clades within paraphyletic master clusters (II and III). This indicates that XIP from these clades are closely related, consistent with previous work (Lopez et al. 2012; Venkatesh et al. 2015).

The XIP are considered as a singular MIP sub-family. Sequence analysis confirms that XIP display an original plant taxa-organized pattern of evolution while maintaining species-specific structural features such as the exon–intron splicing junctions. All this suggests that XIP sequences are closely inter-related, and points to possible evolution from a common ancestor.

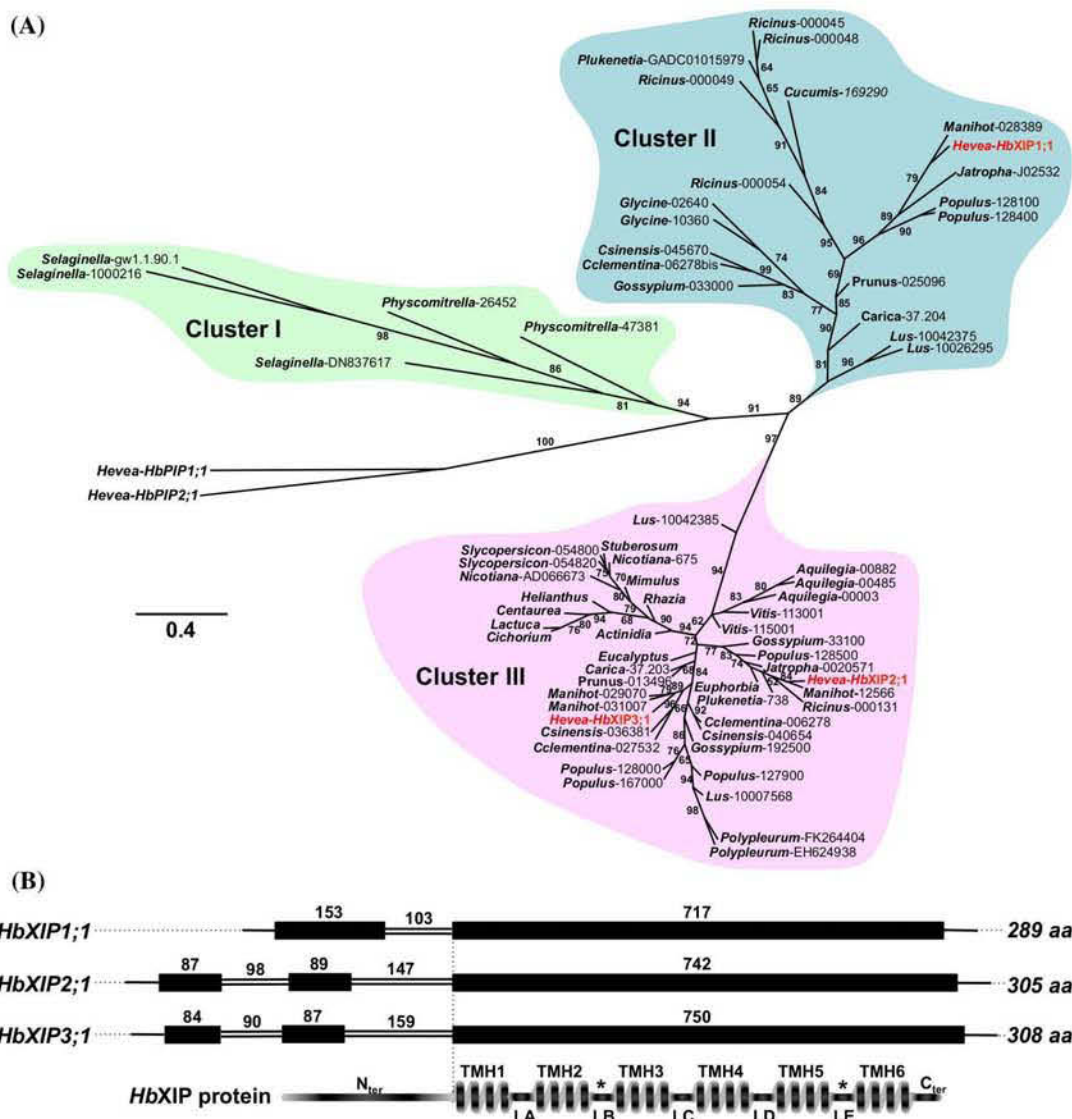


Fig. 1 Valuer's *HbXIP* subfamily. **a** Unrooted phylogeny of XIP protein sequences from *H. brasiliensis* and selected *Viridiplantae*. Numbers at the nodes represent percent of bootstrap values (above 60 %) based on 1000 reassembling. The distance scale denotes the evolutionary distance expressed in number of amino acid substitutions per site. The three *Hevea* XIPs sequences are highlighted in red. The colored clusters mark the three major XIP phylogenetic subdivisions of *Viridiplantae*. Species and accession numbers are listed in Supplementary Tab S1. *HbPIP1* and *HbPIP2* sequences from *H. brasiliensis*

were introduced as outliers. **b** Schematic representation of the three *HbXIP* genes including exons (solid line), introns (double line), number of nucleic acids for each segment, and corresponding amino acid number. *HbXIP* protein structure is detailed with the six putative trans-membrane helices (TMH), the five inter-helice loop regions (LA–LE) and the terminal segments (N_{ter} and C_{ter}). AQP signature NPAs are included within loop B (*LBα_{NPA1}) and loop E (*LEα_{NPA2}). Details of the *HbXIP* genes and protein sequences are available in Supplementary Fig. S1 and S2

Conserved functional roles of XIP in the MIP superfamily suggested by a comparative analysis, modeling by homology, and in vivo functional tests

In contrast to PIP sequences, little is known to date about XIP function, and particularly about the effective regulation sites in their primary sequence directly involved in

their transport activities. In addition, XIP from different plant species are reported to show some contrasting transport functionalities (Bienert et al. 2011; Lopez et al. 2012). Clearly, *Hevea* XIP fit the conventional topology of the MIP superfamily (Supplementary Fig. S3A). However, when XIP amino acid sequences are compared with *SoPIP2;1* from *Spinacia oleracea*, Törnroth-Horsefield

et al. 2006), new distinctive structural features that could affect the structure and/or the diffusion function of MIP emerge (Fig. 2; Supplementary Fig. S3BC). They were sustained through a realistic view of their three-dimensional organization. This work mainly addresses the characterization of the *HbXIP2;1* isoform, since this is the only *HbXIP* transcribed in our biological conditions.

General shape of XIP cavity

The structural analysis of MIP has so far helped to determine or understand key features of their solute transport capacity, supported by what is already established for other members. Beyond their conserved 3D shape in the superfamily, three structural signatures located within or near the cavity, namely NPA signatures, the aromatic/Arg filter and Froger's signature, have been commonly used to associate the channel with a particular transport.

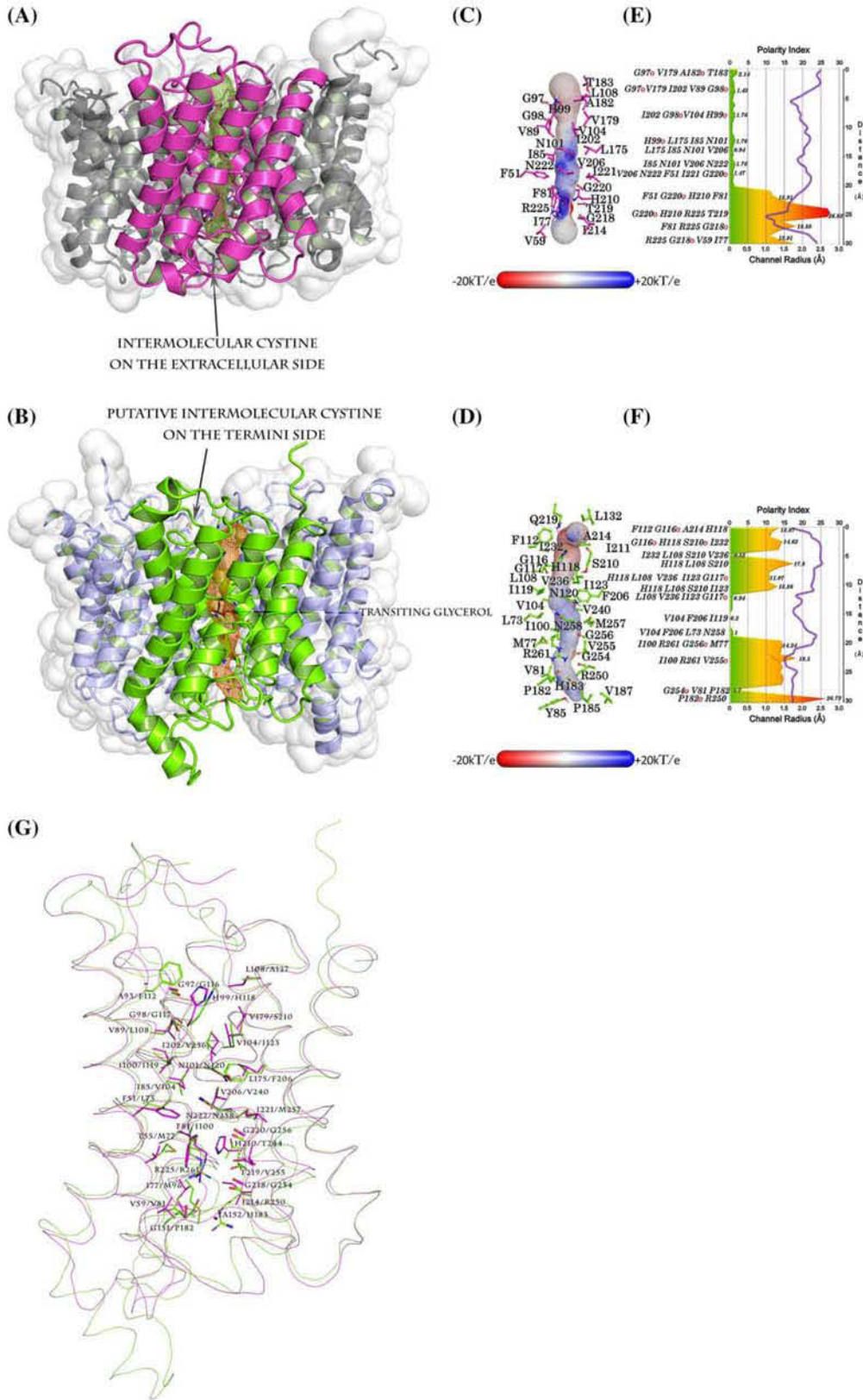
HbXIP comprises six membrane-spanning α -helical regions (TMH1 to TMH6), separated by five hydrophilic loops (LA–LE) (Fig. 1b). The N- and C-terminal ends of the protein face the cytoplasmic side of the membrane. The subcellular localization of YFP-*HbXIP2;1* fusion in tobacco leaf epidermal cells by agroinfiltration lends direct support to this membrane prediction (Fig. 3). A substantial signal is located at the plasma membrane, and this result confirms the *NtXIP1;1* location already reported by Bienert et al. (2011). However, in our experiments, we observed an additional fluorescence at the nucleus and the endoplasmic reticulum (i.e. endomembrane system). Whether this signal is not an artefact, this unexpected endomembrane system fluorescence identified for *HbXIP2;1* is interesting, and suggests a possible recruiting system based on intracellular membrane trafficking to modulate the cell permeability to particular osmolytes, in this case between cytosol and a part of the morphoplasm. Such a localization pattern deserves more thorough exploration. Of the five hydrophilic loops, LB and LE present the highest level of similarity between XIP counterparts (Fig. 2, Supplementary Fig. S3A). Structural analysis shows the presence of two hemipores that face each other inside the membrane, forming an iconic hourglass-like shape (Fig. 2, Supplementary Fig. S4). These two inner protrusions pointing into the core of the protein structure, also named the “aquaporin fold” (Murata et al. 2000), are part of the archetypal MIP structure. They contain the two conserved NPA (Asn-Pro-Ala) signatures, which are located at the center of the monomer pore and intervene in the channel interior constriction as part of a solute and/or water selectivity filter (Chaumont et al. 2005). The first NPA exhibits the less conserved sequence <N/S-P-L/I/V/A>, and the second motif harbors the conserved residues <N-P-A>. A fine reading of a complete XIP alignment shows that the NPA

Fig. 2 I-TASSER model comparison of *HbXIP2;1* (**b, d, f**) with the high resolution structure of *Spinacia oleracea* *SoPIP2;1* (**a, c, e**) in the opened state. **a, b** The tetramers are shown with one of the four subunits highlighted in a bright color (magenta for *SoPIP2;1* and green for *HbXIP2;1*). A grid, calculated with MOLE 2.0, covers the course of the transported molecules within the pore. By analogy with the structure of *SoPIP2;1*, for which the position of a cystine at the extracellular space is shown, a plausible intermolecular disulfide bridge is proposed involving the N-terminal extremity of TM5, since it is compatible in terms of distance according to the model. The electrostatics calculated with APBS (using the PARSE forcefield) for both channels (**c, d**) are displayed at the surfaces of the pores. The positions involved in the constitution of the pores are drawn and labeled with a balls-and-sticks representation. A charge gradient appears to be orientated from acid (red) to basic (blue) following a vertical direction from into out in both cases. The changes in polarity index and the pore dimensions are drawn in a diagram built (**e, f**) on MOLE 2.0 raw data (the letter *o* in red next to the amino acid name indicates the major contribution of the backbone carbonyl group). The indices indicate a more polar vestibule of the inner side for *HbXIP2;1* than for *SoPIP2;1* over the first third of the course, but afterwards the orders of magnitude are comparable with only few subtle differences. The pore diameters along the channel are very close in both cases. **g** Trace representation of the superimposition performed by Mustang of *HbXIP2;1* with the high resolution structure of *SoPIP2;1*. Residues at similar positions surrounding the pore are revealed in wireframe. Figure 2 is offered in high-definition format in the Supplementary Fig. 10

motifs are integrated within a larger conserved region: <P- ψ -S/T-G-G-H/F- ψ -N/S-P- ψ /T> for the first NPA motif, and <G- ψ -G/S- ψ -N/S-P-A/S-R-C- ψ > for the second one (where ψ is typically a hydrophobic residue) (Lopez et al. 2012). These regions constitute remarkable hallmarks that quickly discriminate XIP members from among other MIP counterparts.

The aromatic/Arg (or ar/R) filter is composed of four residues. Given their position in the pore constriction region (Fig. 2, Supplementary Fig. S3A), and their predictive intrinsic physicochemical behaviors, they have been considered as co-defining the substrate selectivity (Sui et al. 2001; Forrest and Bhawe 2008). The *HbXIP* ar/R tetrad signature harbors specific plant XIP profiles including TMH2(F81I/F81V)-TMH5(H210I/H210T)-LB α _{NPA1}(T105T/T105S)-LE α _{NPA2}(R225) residues.

In general, each MIP subfamily exhibits specific variations in the amino acid composition of NPA motifs and ar/R filter (Anderberg et al. 2011; Hove and Bhawe 2011), some of which could provide spatial compensations in terms of both occupancy and physicochemical properties. Such amino acid substitutions within the pore should thus be considered as key features accounting for major evolutionary changes in the protein's functional fate. Plant XIPs exhibit some specific features within the predicted pore regions, suggesting a discrimination between two sister groups, Clusters II and III, where different residues can be found at specific positions: TMH2 (F vs. I/V) and



TMH5 (H vs. T/I). Taken together, the duet histidine (TMH5) and arginine (LE $\alpha_{\text{NPA}2}$ position) are typical of water-specific PIP2 structure (as observed for *HbPIPs*), both providing donor hydrogen bonds for water molecules. The backbone also contributes to the hydrogen bond acceptor network along the channel in correspondence with several positions of the highly conserved embedded loops (SGG motif on LB $\alpha_{\text{NPA}1}$ or G/P on LC).

Like other plants XIPs, the surrounding residues lining the lumen of the cavity at its entrance display a slightly less polar profile near the ar/R filter compared with other *Hevea* or plant MIPs (Fig. 2c–f). According to some authors, this moderately hydrophobic feature could favor the transport of polar uncharged molecules such as glycerol, urea, and metalloids, but not permeability to water (Bienert et al. 2011; Lopez et al. 2012). We also note that XIP ar/R resembles some *Hevea* NIP and TIP (data not shown). Both are able to transport these bulky molecules, but interestingly have been shown to have weak or no permeability to water (Dynowski et al. 2008; Bienert et al. 2011; Lopez et al. 2012). Accordingly, there is an ongoing debate concerning probable functional redundancy between these sub-families that occurred during plant evolution, especially since XIP seem to have disappeared from several plant genomes such as coniferophyts, monocotyledons, and various dicotyledons such as *Arabidopsis* (Gupta and Sankararamakrishnan 2009; Bienert et al. 2011; Anderberg et al. 2012; Venkatesh et al. 2013). This assumption incurs the risk of it becoming a commonly used truism to definitely explain the discontinuous presence of XIP in the plant kingdom. More recently, Abascal et al. (2014) advanced a potential deep orthology between XIP, HIP, TIP and AQP8, and that speciation events would have expunged some MIP subfamilies between reign and/or organisms. Clarifying the physiological benefits that XIP confer to organisms will help to answer this paradoxical question.

Finally, five other residues (P1–P5 positions also called Froger's signature) are usually predicted to play a functional role in MIP activity. The diversity at these positions between MIP subfamilies has been correlated to substrate selectivity, discriminating orthodox "water channel" aquaporins (AQPs) from "glycerol transporter" aquaglyceroporins (GLPs) (Froger et al. 1998; Lagree et al. 1999). For XIP, Froger's signature contains a number of hydrophobic amino acids with P1(V160/M)-P2(C262)-P3(A266/S)-P4(F280)-P5(W281) residues (positions numbered according to *HbXIP2;1*), suggesting a transport of bulky hydrophobic molecules (Gupta and Sankararamakrishnan 2009). However, we parse this motif for *HbXIP2;1* cautiously (Supplementary Fig. S5). The remote location of the above residues from the cavity suggests that (even for P2, the only nearby constriction site) they may not play this

role, but instead a mechanical one, probably through involvement in the placement of the alpha helix bundle.

Physicochemical environment of the XIP cavity

Notwithstanding the involvement of these structural checkpoints regarding the potential XIP channel specificity as a whole, they may play their full role when combined with other factors such as physicochemical conditions or dedicated regulatory effectors. 3D structure prediction is the easiest reliable alternative to experimental structure resolution, especially when membrane proteins are concerned (Du et al. 2015). Fortunately, high-resolution structures of AQPs are available and can be used as templates for a homology study approach (Yang et al. 2015). *HbXIP2;1* structure was therefore modeled with I-TASSER software using *SoPIP2;1* as reference. The scores provided by the program indicate that the modeled coordinates are satisfactory: notably, the C-score (estimating the quality of the prediction) is 0.88, suggesting a good level of confidence in the prediction (the normal range of C-scores being between -5 and 2). A further analysis driven with MolProbity (Chen et al. 2010) indicates that the model lies within the acceptable range in terms of geometry for an aquaporin. Compared with the 3.90 Å resolution structure of *SoPIP2;1* (pdb:2b5f) the proportion of dihedral angles to be within the favored Ramachandran limits is slightly higher (86.56 vs. 72.65 % for chain A of 2b5f) and the proportion of residues to be outside those limits (or Ramachandran outliers) is smaller (3.95 vs. 9.4 % for chain A of 2b5f). To sum up, 96.1 % (244/254) of all residues are in the allowed regions for the model, whereas this is the case for only 90.6 % (212/234) of all the residues of the structure. Concerning the rotamer evaluation, values of the same order are reached for both cases (82.59 % for the *HbXIP2;1* model vs. 77.84 % for chain A of 2b5f are within the favored limits). Superimposition shows that the *HbXIP2;1* modeled channel resembles that of *SoPIP2;1* with only a few differences in amino acid composition (Fig. 2g, Supplementary Fig. S3B). This suggests that the evolutionary distance between plant PIPs and XIPs is short, but this serves yet again to prove the existence of a potential deep orthology connection between a specific protein subfamily (i.e. XIP) and its superfamily (i.e. MIP) (Abascal et al. 2014).

PIP and XIP differences mostly comprise changes at four positions around the pore bottleneck: L175/F206, F51/L73, F81/I100 and H210/T244. The mutations of the first two positions tend to compensate for each other, but taken together, the last two are mostly responsible for both a larger diameter and a lower polarity index at the constriction zone for *HbXIP2;1* (Fig. 2e, f). The last remarkable change with a possible incidence on transport

water permeability and thus cannot be considered as a water channel.

With water transport ruled out, we assessed a possible glycerol transport capability while keeping in view that the sequence between *HbXIP2;1* and *NtXIP1;1* (an efficient glycerol permease, Bienert et al. 2011) strongly differs (identity of 65 %) (Supplementary Fig S3). A functional assay for glycerol was carried out on the constitutive yeast mutant *Δfps1* (strain JT4014) lacking the endogenous glycerol transporter FPS1, which complemented by a constitutive expression of an efficient glycerol transporter, exhibits a growth defect consecutive to osmotic shock by the use of high concentrations of 1 M sorbitol (Luyten et al. 1995). Qualitative data from intact cell growth assay (Fig. 4b) and semi-quantitative data related to the [¹⁴C]-glycerol uptake (Fig. 4c) clearly show that *HbXIP2*-transfected yeast cells take up glycerol significantly faster than mock-transfected cells. This indicates that *HbXIP2* acts as a channel protein that facilitates glycerol diffusion, at least in yeast. This result echoes the physiological effect of *AtNIP1* and *AtNIP2* overexpressed in an *FPS1*-defective yeast strain (Weig and Jakob 2000) or *Chlamydomonas reinhardtii* *CrMIP1* (Anderca et al. 2004) as glycerol channels. Taken together, *HbXIP2;1* functional data are in line with the transport capabilities of *NtXIP1;1* (Bienert et al. 2011). A further crucial aspect highlighted here is that XIP, although they exhibit a strict phylogenetic allocation in a plant lineage fashion (Fig. 1), can deliver contrasting transport abilities at the intra-clade level. *PtXIP2;1* and *HbXIP2;1*, two comparatively closed sequences (79 % identity) found in plant species belonging to the order

Malpighiales exhibit differential water transport (Lopez et al. 2012), while two sequences comparatively more divergent sequences (Rosidae *HbXIP2;1* vs. Asteridae *NtXIP1;1*, 65 % identity) exhibit common glycerol transport ability. Finally, it suggests that the XIP sub-family is functionally more complex than expected, and that phylogenetic correlations are still often not sufficient to conclude on a specific function between homologs.

Here we consider *HbXIP2;1* as a glyceroporin. On the other hand, on the basis of these kinds of observations, this channel is usually considered as the only actor of transport selectivity. Nonetheless, when we compare the central channels for amino acid composition and relative structure between a PIP archetype like *SoPIP2;1* and an XIP model like *HbXIP2;1*, the difference remains subtle (Fig. 2g, Supplementary Fig. S3B). Even if this finding is based on a modeled structure, the relatively high similarity shared by AQP in general and the quite satisfactory superimposition of the lateral chains of key amino acids (comparing the model with a high resolution structure of AQP) (Supplementary Fig. 3) intervening in particular in the lumen of the pore is still a measure of the reliability of the *HbXIP2;1* model. The subtle difference observed may thus suggest that the specificity of the transport does not reside solely in the channel properties. In such a hypothesis, the specificity could more likely arise from other structural elements of the aquaporin interacting with a dedicated partner responsible for the transport selectivity or effectiveness. Water is small and polar, and the two compared channels are both polar and apolar—with a slight difference around the vestibule of the inner side—but with an acid–base gradient

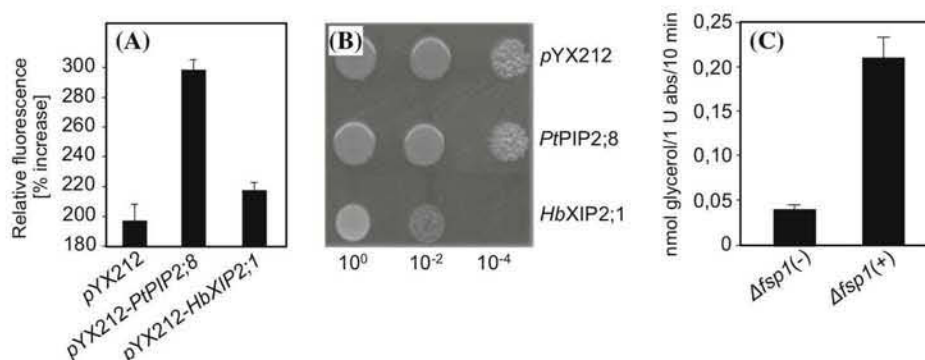


Fig. 4 Osmotic water and glycerol transport assay. **a** Analysis of water transport of *HbXIP2;1* aquaporin expressed in yeast. Relative fluorescence signal obtained after 0.2 s following osmotic shock, for yeast strains expressing *HbXIP2;1* and *PtPIP2;8* (positive control) are compared with the negative control of cells transformed with empty vector. Cells were loaded with CFSE and subjected to hypo-osmotic shock. The signal obtained corresponded to an average of four individual measures. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). **b** Functional complementation of *Dfps1* yeast strain transformed with the centromeric *pYX212* vector expressing *HbXIP2;1* or *PtPIP2;8*. Cells

were grown on agar plates with synthetic minimal medium (lacking uracil) containing 1 M sorbitol. The initial suspension at 1 unit of A_{600nm}/ml was diluted 1/10 four times. Empty, *Δfps1* transformed with the empty *pYX212* vector; *PtPIP2;8*, *Δfps1* transformed with *pYX212-PtPIP2;8* cDNA; *HbXIP2;1*, *Δfps1* transformed with *pYX212-HbXIP2;1* cDNA. **c** Analysis of glycerol transport of *HbXIP2;1* aquaporin by radioactive substrate uptake. Yeast strains (JT4014-*Δfps1*) transformed with *pYX212-HbXIP2;1* (+) or the empty vector (*pYX212*: (-)) were assayed for uptake of [¹⁴C]-glycerol. Data are mean \pm SEM ($n = 3$)

oriented in the same orientation (Fig. 2c–f). In our case, and given the heterologous biological context, *HbXIP2;1* lacking effectiveness in water transport could then be ascribed to the absence of a specific regulator dedicated to controlling the aquaporin gating. If we assume that the functioning of an aquaporin can be roughly summarized as the adoption of two limit states or two limit conformations (favored thermodynamically), an opened and a closed form, then the activity of a regulator (*inter alia* the cycling of kinases and phosphatases to change the phosphorylated state of residue participating in a lock with a basic residue, or the influence of a conditional partner on the first helical turn at the amino-terminal of TMH1 displacing a negative charges borne by a largely conserved acid residue) would consist in directing the change of conformation from one to the other. In such systems, the regulator should no longer be neglected and studying the activity of an aquaporin should require identifying that putative essential partners or chaperons. On the way to understanding the mechanism, this latter identification could first be bypassed by using the targeted mutation of key residues involved in the upholding of the gate on a closed state, whose expected consequence would be to clear the way in the central channel for any molecule compatible in terms of size and charge. Even so, to gain a full picture of the sequence of events in the regulation in situ, identification of the regulators is mandatory.

The underlying mechanism (which to our knowledge has not yet been found for the XIP subfamily) implies the movement of mobile portions borne by the aquaporin itself. For instance, in our model of *HbXIP2;1* and as previously put forward (Tournaire-Roux et al. 2003), loop D could act as a lid covering up inner mouthpiece. A largely conserved positive residue (K221) rightly placed in the middle of loop D sustains a possible lock secured by pairing with a more static negative charge facing that structural element. This would block free circulation of water as observed in our experimental study. In addition to our hypothesis, both open and closed states were previously observed at atomic resolution for spinach *SoPIP2;1*. The closed form results essentially from the presence of a cation (cadmium, probably calcium in situ), which, by neutralizing the negative charges of two carboxylates, stabilizes the first helical turn of TMH1 and indirectly loop D. In such a form, loop D adopts a twisted antiparallel β -hairpin shape, and the aspartate 191 of the RDS motif bridges the displaced lysine of the N-terminal end (direct consequence of TMH1 first helical turn stabilization) leading to the occlusion of the tunnel (Törnroth-Horsefield et al. 2006). This closed conformation supports the authors hypothesis of a hydrophobic gating controlled by the protonation state of a conserved residue, a histidine in the middle of loop D. Beyond its natural pH sensor activity consisting of switching from a

charged to a neutral state and vice versa, histidine 193 can interact with a negatively charged residue at the beginning of TMH1 depending on local pH conditions. This can result in placing loop D before the pore and blocking any molecular circulation through it, or instead, moving it away to allow a flow through. Here again, these authors thoroughly tested the implications of histidine 193 and loop D in different conditions and with complementary approaches, leaving less room for doubt about the major role of that loop for that particular aquaporin, *SoPIP2;1*. In this light, the absence of an observed water transport for *HbXIP2;1* is thus to be taken cautiously and remains to be demonstrated in a native context. In a situation where a closed state is expected, and within the limits of the heterologous system employed to test a transport capability (in others words where dedicated regulators could be missing), it is legitimate to wonder about the observed transport in the case of glycerol. First we note that we are only able to monitor and provoke an “out-to-in” glycerol transport because of experimental limitations. We consider that it is probably directly correlated with the proneness of osmolytes such as glycerol to alter locally by their presence the surrounding solvation enough to favor the opened conformation, which frees the way for glycerol itself and associated water if necessary; while in the absence of glycerol, water fills the entire channel without causing structural distortions to the protein, so that when it is closed, it remains closed. Also in our test, the introduction of 1 mM glycerol in the external medium favors an entering flow, the outer side (or vestibule) of *HbXIP2;1* being opened. Once it has entered, because of its size (with a diameter around 3.6 Å in the smallest dimension, while the pore is around 3.0 Å in the narrowest zone) and its relatively extended interaction with the channel, it might induce a conformational change producing allosteric repercussions on the lid position. Certainly, as seen by others in molecular dynamics simulations on aquaglyceroporins, transiting glycerol has no alternative other than to line-up in a single line with water (smaller and interacting with isolated glycerol by establishing H-bonds in a “fluid” of water) in between (Chen 2013). The biological relevance of such a process where an extra osmolyte (higher concentration) may enter the cell by an initially closed aquaporin (to impede water coming out, for instance) could be to ensure prompt equalization of the above osmolyte at both sides of the membrane barrier and inhibit water leak by the same aquaporin at the same time.

On the basis of these structural and functional considerations, elucidation of the physiological role of XIP in plants through in-depth functional studies with XIP variants in key residues will answer these important, still open questions.

water permeability and thus cannot be considered as a water channel.

With water transport ruled out, we assessed a possible glycerol transport capability while keeping in view that the sequence between *HbXIP2;1* and *NtXIP1;1* (an efficient glycerol permease, Bienert et al. 2011) strongly differs (identity of 65 %) (Supplementary Fig S3). A functional assay for glycerol was carried out on the constitutive yeast mutant *Δfps1* (strain JT4014) lacking the endogenous glycerol transporter FPS1, which complemented by a constitutive expression of an efficient glycerol transporter, exhibits a growth defect consecutive to osmotic shock by the use of high concentrations of 1 M sorbitol (Luyten et al. 1995). Qualitative data from intact cell growth assay (Fig. 4b) and semi-quantitative data related to the [¹⁴C]-glycerol uptake (Fig. 4c) clearly show that *HbXIP2*-transfected yeast cells take up glycerol significantly faster than mock-transfected cells. This indicates that *HbXIP2* acts as a channel protein that facilitates glycerol diffusion, at least in yeast. This result echoes the physiological effect of *AtNIP1* and *AtNIP2* overexpressed in an *FPS1*-defective yeast strain (Weig and Jakob 2000) or *Chlamydomonas reinhardtii* *CrMIP1* (Anderca et al. 2004) as glycerol channels. Taken together, *HbXIP2;1* functional data are in line with the transport capabilities of *NtXIP1;1* (Bienert et al. 2011). A further crucial aspect highlighted here is that XIP, although they exhibit a strict phylogenetic allocation in a plant lineage fashion (Fig. 1), can deliver contrasting transport abilities at the intra-clade level. *PtXIP2;1* and *HbXIP2;1*, two comparatively closed sequences (79 % identity) found in plant species belonging to the order

Malpighiales exhibit differential water transport (Lopez et al. 2012), while two sequences comparatively more divergent sequences (Rosidae *HbXIP2;1* vs. Asteridae *NtXIP1;1*, 65 % identity) exhibit common glycerol transport ability. Finally, it suggests that the XIP sub-family is functionally more complex than expected, and that phylogenetic correlations are still often not sufficient to conclude on a specific function between homologs.

Here we consider *HbXIP2;1* as a glyceroporin. On the other hand, on the basis of these kinds of observations, this channel is usually considered as the only actor of transport selectivity. Nonetheless, when we compare the central channels for amino acid composition and relative structure between a PIP archetype like *SoPIP2;1* and an XIP model like *HbXIP2;1*, the difference remains subtle (Fig. 2g, Supplementary Fig. S3B). Even if this finding is based on a modeled structure, the relatively high similarity shared by AQP in general and the quite satisfactory superimposition of the lateral chains of key amino acids (comparing the model with a high resolution structure of AQP) (Supplementary Fig. 3) intervening in particular in the lumen of the pore is still a measure of the reliability of the *HbXIP2;1* model. The subtle difference observed may thus suggest that the specificity of the transport does not reside solely in the channel properties. In such a hypothesis, the specificity could more likely arise from other structural elements of the aquaporin interacting with a dedicated partner responsible for the transport selectivity or effectiveness. Water is small and polar, and the two compared channels are both polar and apolar—with a slight difference around the vestibule of the inner side—but with an acid–base gradient

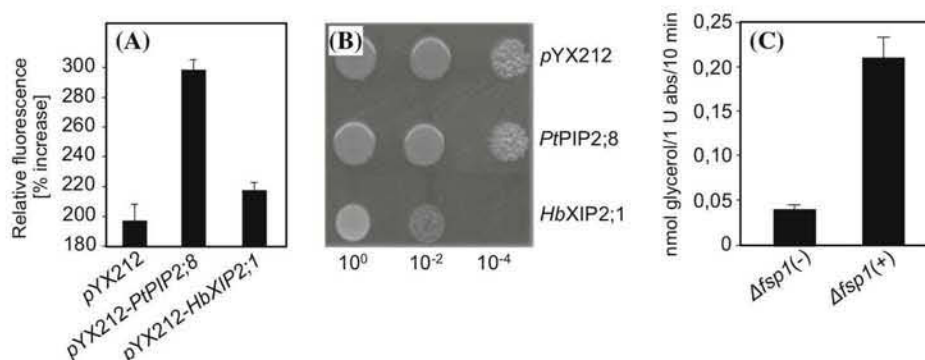


Fig. 4 Osmotic water and glycerol transport assay. **a** Analysis of water transport of *HbXIP2;1* aquaporin expressed in yeast. Relative fluorescence signal obtained after 0.2 s following osmotic shock, for yeast strains expressing *HbXIP2;1* and *PtPIP2;8* (positive control) are compared with the negative control of cells transformed with empty vector. Cells were loaded with CFSE and subjected to hypo-osmotic shock. The signal obtained corresponded to an average of four individual measures. Data are mean \pm SEM ($n = 3$). **b** Functional complementation of *Dfps1* yeast strain transformed with the centromeric *pYX212* vector expressing *HbXIP2;1* or *PtPIP2;8*. Cells

were grown on agar plates with synthetic minimal medium (lacking uracil) containing 1 M sorbitol. The initial suspension at 1 unit of A_{600nm}/ml was diluted 1/10 four times. Empty, *Δfps1* transformed with the empty *pYX212* vector; *PtPIP2;8*, *Δfps1* transformed with *pYX212-PtPIP2;8* cDNA; *HbXIP2;1*, *Δfps1* transformed with *pYX212-HbXIP2;1* cDNA. **c** Analysis of glycerol transport of *HbXIP2;1* aquaporin by radioactive substrate uptake. Yeast strains (JT4014-*Δfps1*) transformed with *pYX212-HbXIP2;1* (+) or the empty vector (*pYX212*: (-)) were assayed for uptake of [¹⁴C]-glycerol. Data are mean \pm SEM ($n = 3$)

oriented in the same orientation (Fig. 2c–f). In our case, and given the heterologous biological context, *HbXIP2;1* lacking effectiveness in water transport could then be ascribed to the absence of a specific regulator dedicated to controlling the aquaporin gating. If we assume that the functioning of an aquaporin can be roughly summarized as the adoption of two limit states or two limit conformations (favored thermodynamically), an opened and a closed form, then the activity of a regulator (*inter alia* the cycling of kinases and phosphatases to change the phosphorylated state of residue participating in a lock with a basic residue, or the influence of a conditional partner on the first helical turn at the amino-terminal of TMH1 displacing a negative charges borne by a largely conserved acid residue) would consist in directing the change of conformation from one to the other. In such systems, the regulator should no longer be neglected and studying the activity of an aquaporin should require identifying that putative essential partners or chaperons. On the way to understanding the mechanism, this latter identification could first be bypassed by using the targeted mutation of key residues involved in the upholding of the gate on a closed state, whose expected consequence would be to clear the way in the central channel for any molecule compatible in terms of size and charge. Even so, to gain a full picture of the sequence of events in the regulation *in situ*, identification of the regulators is mandatory.

The underlying mechanism (which to our knowledge has not yet been found for the XIP subfamily) implies the movement of mobile portions borne by the aquaporin itself. For instance, in our model of *HbXIP2;1* and as previously put forward (Tournaire-Roux et al. 2003), loop D could act as a lid covering up inner mouthpiece. A largely conserved positive residue (K221) rightly placed in the middle of loop D sustains a possible lock secured by pairing with a more static negative charge facing that structural element. This would block free circulation of water as observed in our experimental study. In addition to our hypothesis, both open and closed states were previously observed at atomic resolution for spinach *SoPIP2;1*. The closed form results essentially from the presence of a cation (cadmium, probably calcium *in situ*), which, by neutralizing the negative charges of two carboxylates, stabilizes the first helical turn of TMH1 and indirectly loop D. In such a form, loop D adopts a twisted antiparallel β -hairpin shape, and the aspartate 191 of the RDS motif bridges the displaced lysine of the N-terminal end (direct consequence of TMH1 first helical turn stabilization) leading to the occlusion of the tunnel (Törnroth-Horsefield et al. 2006). This closed conformation supports the authors hypothesis of a hydrophobic gating controlled by the protonation state of a conserved residue, a histidine in the middle of loop D. Beyond its natural pH sensor activity consisting of switching from a

charged to a neutral state and vice versa, histidine 193 can interact with a negatively charged residue at the beginning of TMH1 depending on local pH conditions. This can result in placing loop D before the pore and blocking any molecular circulation through it, or instead, moving it away to allow a flow through. Here again, these authors thoroughly tested the implications of histidine 193 and loop D in different conditions and with complementary approaches, leaving less room for doubt about the major role of that loop for that particular aquaporin, *SoPIP2;1*. In this light, the absence of an observed water transport for *HbXIP2;1* is thus to be taken cautiously and remains to be demonstrated in a native context. In a situation where a closed state is expected, and within the limits of the heterologous system employed to test a transport capability (in others words where dedicated regulators could be missing), it is legitimate to wonder about the observed transport in the case of glycerol. First we note that we are only able to monitor and provoke an “out-to-in” glycerol transport because of experimental limitations. We consider that it is probably directly correlated with the proneness of osmolytes such as glycerol to alter locally by their presence the surrounding solvation enough to favor the opened conformation, which frees the way for glycerol itself and associated water if necessary; while in the absence of glycerol, water fills the entire channel without causing structural distortions to the protein, so that when it is closed, it remains closed. Also in our test, the introduction of 1 mM glycerol in the external medium favors an entering flow, the outer side (or vestibule) of *HbXIP2;1* being opened. Once it has entered, because of its size (with a diameter around 3.6 Å in the smallest dimension, while the pore is around 3.0 Å in the narrowest zone) and its relatively extended interaction with the channel, it might induce a conformational change producing allosteric repercussions on the lid position. Certainly, as seen by others in molecular dynamics simulations on aquaglyceroporins, transiting glycerol has no alternative other than to line-up in a single line with water (smaller and interacting with isolated glycerol by establishing H-bonds in a “fluid” of water) in between (Chen 2013). The biological relevance of such a process where an extra osmolyte (higher concentration) may enter the cell by an initially closed aquaporin (to impede water coming out, for instance) could be to ensure prompt equalization of the above osmolyte at both sides of the membrane barrier and inhibit water leak by the same aquaporin at the same time.

On the basis of these structural and functional considerations, elucidation of the physiological role of XIP in plants through in-depth functional studies with XIP variants in key residues will answer these important, still open questions.

Physiological framework for potential *HbXIP2;1* involvement

Factual molecular information

For decades pretreatment with the ethylene releaser Ethrel[®] underneath the tapping cut has been used to stimulate latex production (d'Auzac and Ribaillier 1969). The rubber clone PB217 used in this study is well known for its high yield potential: although it shows a low yield in the absence of ethylene treatment, it can reach high and sustainable production under hormonal stimulation, owing to a strong metabolic activity and a high sugar loading capacity (Fig. 5; Obouayeba et al. 1996; Lacote et al. 2010). The laticifer network in the phloem tissue does not have symplastic connections with the surrounding cells (De Fay et al. 1989). Because of the semi-permeability of the plasma membrane, a controlled transport of water was thought to be involved in the dilution of latex on tapping that is crucial for its fluidity and consequently for the rubber production yield. Previous studies demonstrated that the up-regulation of aquaporins in response to tapping and ethylene treatments might underpin water exchanges between xylem, phloem and laticifer tissues, and thus latex dilution (Tungngoen et al. 2009, 2011; An et al. 2015). Concomitantly, the up-regulation of sucrose and monosaccharide transporter genes in response to the ethylene treatment is thought to increase sugar upload in the laticifers, thus stimulating the rubber biosynthesis pathway

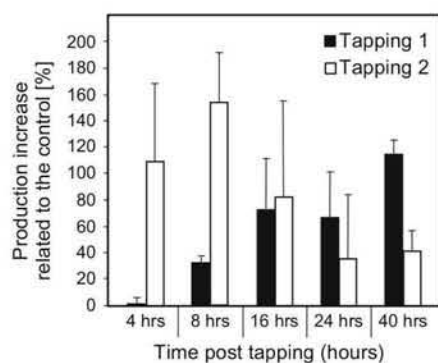


Fig. 5 Latex yield of exploited PB217 clones after ethylene treatment and two consecutive taps. Batches of three homogenous mature trees, regularly tapped for 2 years but left to rest for 3 months, were pretreated with 2 % of the ethylene releaser Ethrel[®] 4, 8, 16, 24 and 40 h before the first tap (TAP1). After 3 days without treatment, a second tap was performed on the same trees (TAP2). Latex production is expressed in percentage of increased production in relation to unstimulated tree production. The formula used was: Production increase (%) = ((Production of stimulated tree – Production of unstimulated tree) / Production of stimulated tree) × 100. Bars represent the biological standard deviation

and globally latex regeneration while increasing the osmotic force necessary for driving water fluxes (Dusotoitcoucaud et al. 2009, 2010a, b; Tang et al. 2010; Tungngoen et al. 2011).

In the present work, study of XIP members was concurrently conducted with PIP and PLT counterparts, suggesting that XIP may play a role in this scenario. Among the three *Hevea* XIP genes for which expression was monitored by real-time RT-PCR, only *HbXIP2;1* appeared to be expressed. Whatever the physiological conditions and organs, no signal was detected for *HbXIP1;1* and *HbXIP3;1*. *HbXIP2;1* transcripts were found in all the vegetative organs examined (Fig. 6a, Supplementary Fig. S6), with an abundant constitutive accumulation in young and mature leaves (dropping drastically in senescent leaves), buds, young developing stem, bark and latex. The accumulation of *HbXIP2;1* transcripts in bark and laticifers was also confirmed by in situ hybridization (Fig. 7, Supplementary Figs. S7 and S8). In addition, XIP seem widely distributed within these organs, corroborating most MIP data showing their ubiquitous behavior between and inside various vegetative organs. Extending our analysis to other MIP genes, we found that the relative proportion of each MIP isoform was largely constant throughout the different tissues, in agreement with previous observations in other ligneous species (Lopez et al. 2012; Yue et al. 2014). Exceptionally, the relative proportion of *HbXIP2;1* transcripts compared with the other MIPs was smaller in roots and xylem. We note that constitutive steady-state levels of *HbXIP2;1* in these organs were very similar to those observed for the most expressed *HbPIP* or *HbPLT* genes (Fig. 6b, Supplementary Fig. S6), including in bark and laticifers. The co-regulation of these transporters suggests a common biological involvement. Thus like most AQP, XIP are ubiquitously and constitutively expressed in vegetative plant tissues, suggesting multiple roles of this subfamily for the plant overall (Bienert et al. 2011); however, in view of the physiological context referred to above, only bark and laticifers will be further discussed.

In a context of exploited rubber trees undergoing simultaneous ethylene treatment and successive tapping, *HbXIP2;1* gene expression was up-regulated with a maximum increase 24 and 8 h after ethylene treatment respectively in latex and bark. This profile was conserved on the second tapping, with even higher expression levels. *HbXIP2;1* expression profile was similar to that of *HbPIP1;1*, *HbPIP1;3*, *HbPIP2.2* and *HbPIP2;4* in latex, and the four *HbPIP2* s in bark, which were also up-regulated. Conversely, *HbPIP1;2* was down-regulated in latex, as were *HbPIP2;1* and *HbPIP2;3* in bark (Fig. 8a, b, Supplementary Fig. S9). More interestingly, *HbXIP2;1* expression correlated remarkably well with the kinetics of latex yield of the trees with which the expression analyses

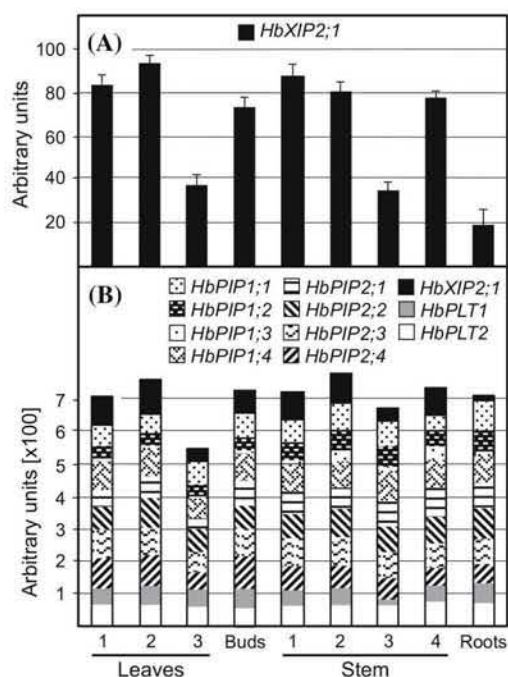


Fig. 6 Constitutive transcript accumulation of *HbXIP2;1*, *HbPIPs* and *HbPLTs* gene in various vegetative organs from *H. brasiliensis* (clone PB217). Transcript accumulation of *HbXIP2;1* gene was monitored alone (a), and in relative proportion compared with *HbPIPs* and *HbPLTs* genes (b). Leaf samples 1, 2, and 3 are young, adult and senescent leaves, respectively. Stem samples 1, 2, 3 and 4 are growing apical parts of stem, bark, xylem and latex, respectively. Expression was monitored using real-time quantitative RT-PCR analyses and normalized with the expression of three housekeeping genes (*HbACT*, *HbCYP* and *Hb18S rRNA*). Arbitrary unit calculation is detailed in Materials and Methods. Expression rates for each isoform of *HbPIP1s*, *HbPIP2s* and *HbPLTs* are detailed in Supplementary Fig. S6. Data correspond to means of three technical repeats from three independent biological experiments, and bars represent the biological standard deviation

were carried out (Fig. 5). In addition, screening the 5'-flanking region of *HbXIP2;1* revealed an AGC box (or AGCCGCC box, SOOO232) (nucleotide position -1425, Supplementary Fig. S1), which is a functional *cis*-ethylene responsive promoter element (Fujimoto et al. 2000). The fact that *HbXIP2;1* and several other transporter genes act in a concerted and regulated manner suggests that *HbXIP2;1*, as a potential glycerol transporter could take an active part in the regulation of ethylene-induced fluidity modulation of the latex, as previously documented for *HbPIP* and *HbPLT*. Water circulation in the inner bark and latex cells may be potentiated by the concomitant up-regulation of both *HbPIP* genes, resulting in a direct increase in water fluxes, and transporter genes such as *HbXIPs* and *HbPLTs*, indirectly increasing the osmotic force by accumulation of polyols and other osmolytes.

An *in situ* glycerol facilitator? An unravelled question for *HbXIP2;1*

The upregulated expression of *HbXIP2;1* coincides with rubber synthesis, yet *HbXIP2;1* appears to facilitate the transport of glycerol in the heterologous system of yeast. Comparison is not proof, but although these molecular analyses were carried out in distinct biological systems or previously reported for other transporters and their potential solutes in similar physiological situations in *H. brasiliensis*, we speculate on a plausible connection between these biological events. The ability to transport glycerol and several organic solutes has been experimentally demonstrated for numerous aquaporins in plant systems ever since the 1990s, but the role, accumulation or partitioning for glycerol specifically as a hub-metabolite fluxed from or between compartments in plants has not yet been investigated. Our study and the capacity to validate many of our hypothesis is restricted by the facts that (1) although the AQP subfamily are physiologically relevant glycerol transporter, the solute is to our knowledge technically impossible to trace and assay, and (2) *H. brasiliensis* is a non-model plant for which metabolic analysis on laticifers and/or functional validation by genetic transformation remain highly complex. Still, there remain important questions about the potential roles that glycerol passing through *HbXIP2;1* might play. Two avenues warrant discussion and exploration: glycerol could be an osmo-protective substance for maintaining cellular integrity, and/or a source of carbon and energy required for rubber biosynthesis.

Is glyceroporin XIP of central importance for laticifer osmoregulation?

The duration of latex outflow during tapping, and the capacity of latex regeneration after tapping are key parameters of rubber production yield. From a biological standpoint, both depend on the hydric fluxes across the liber and laticifer networks. Ethylene treatment acts on both parameters, allowing latex dilution and stimulation of sugar loading. Stressful repeated tapping with hormonal stimulation may dangerously disrupt the hydric homeostasis of the challenged cells, for example by generating reactive oxygen species, leading in extreme cases to the physiological disorder known as "tapping panel dryness" (Sookmark et al. 2002). In most living organisms, a number of different osmolytes are produced or imported by the cells with the objective of improving stress resistance (Chen and Murata 2002). Glycerol is one such osmolyte (Hasegawa et al. 2000), but despite wide occurrence in living organisms, its accumulation in plant cells remains generally very low (Gerber et al. 1988). However, we postulate that a controlled accumulation of glycerol can

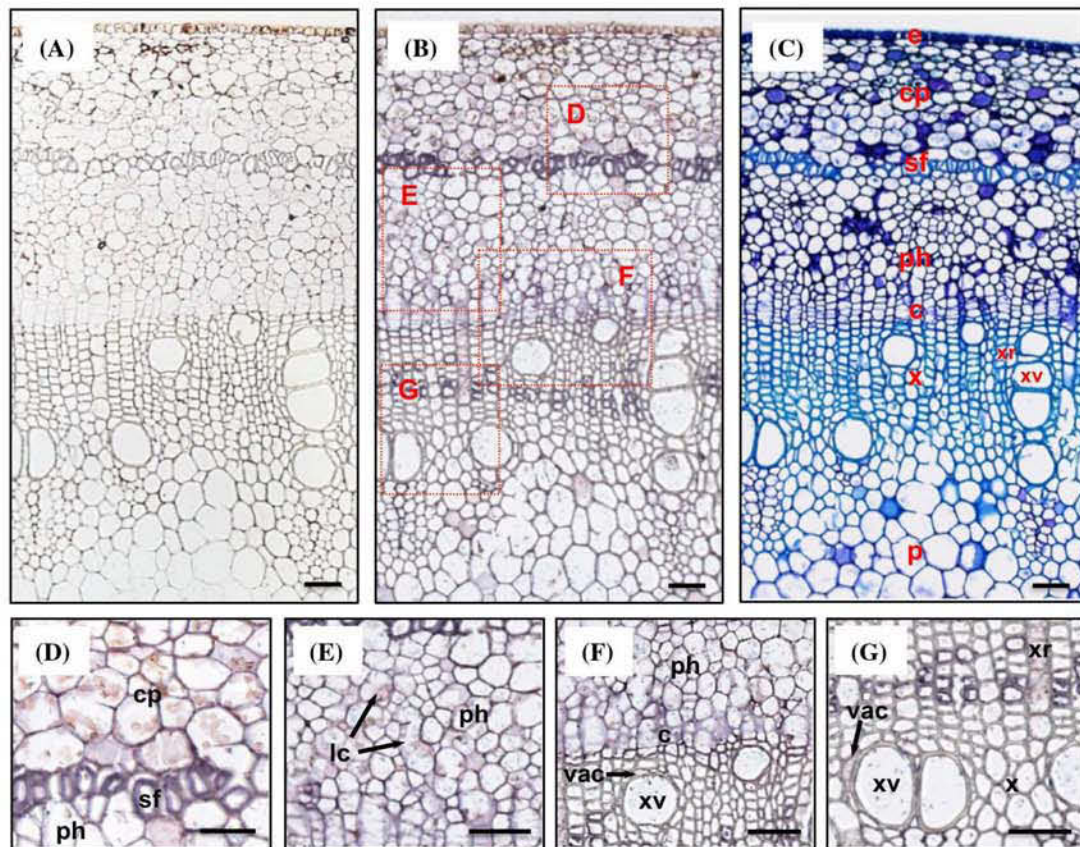


Fig. 7 In situ localization of *HbXIP2;1* mRNA in stems. Transversal sections 10 μm thick from paraffin-embedded *H. brasiliensis* young stem hybridized with specific sense probes (negative control) (a), with antisense probes (positive hybridization) (b, d–f, g), and with a toluidine blue staining (c) to identify the cellular structure. Positive hybridization signals are visualized by violet staining using a DIG-labeled RNA immunodetection system as described in “Materials and Methods”. *c* cambium, *cp* cortical parenchyma, *e* epidermis, *lc*

operate in damaged tissues to maintain the water balance. Together with other sugars, glycerol could act as a “laticiferous osmo-protectant”: it could help prevent the disaggregation of membranes, proteins and multimeric complexes induced by the osmotic stress (Pahlman et al. 2001; Hohmann 2002). In rubber trees, the glyceroporin *HbXIP2;1*, by mediating glycerol transport across plasma membranes in the inner bark and latex cells, may contribute to the osmoprotection of these cells in compensation for the exploitation-induced oxidative stress that jeopardizes membrane integrity (d’Auzac et al. 1997).

Does glyceroporin XIP modulate glycerol import as an energy source for stimulated laticiferous metabolism?

Sucrose is the precursor of rubber synthesis in the laticifers (Tupy 1985). Concomitant increases of sucrose loading,

laticifer cell, *sf* sclerenchyma fiber, *p* pith, *ph* phloem, *vac* vessel associated cell, *x* xylem, *xv* xylem vessel, *xr* xylem ray. Alkaline phosphatase staining controls without probe and a fine description of stem cellular structures are detailed in Supplementary Fig. S7. Original photographs in which selected consensus zones were connected together for creating the artificial pictures A, B and C are given in Supplementary Fig. S8. Scale bar indicates 50 μm

glycolysis and glycerolipid biosynthesis have been demonstrated during an upregulated laticiferous metabolism (Dusotoit-Coucaud et al. 2009, 2010a, b; Tang et al. 2013; Wei et al. 2015). In a cell energy scenario and concurrently to possible re-routing of glycerol and other carbohydrates in producing intermediate substrates for the biosynthesis of rubber precursors, glycerol might also be one of the sucrose routes for glycerol-3-phosphate (G3P) production. Cytosolic influxes of glycerol are known to supply the bioprocesses of carbohydrate fermentation and oxidative phosphorylation. This oxidative pathway includes glycolysis (after glycerol conversion to glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P)) and the G3P shuttle after glycerol conversion to G3P. Both are interconnected biochemical pathways where the G3P shuttle regenerates NAD^+ from NADH , a by-product of glycolysis that contributes to regenerate the ATP pool through the mitochondrial oxidative phosphorylation pathway (Shen et al.

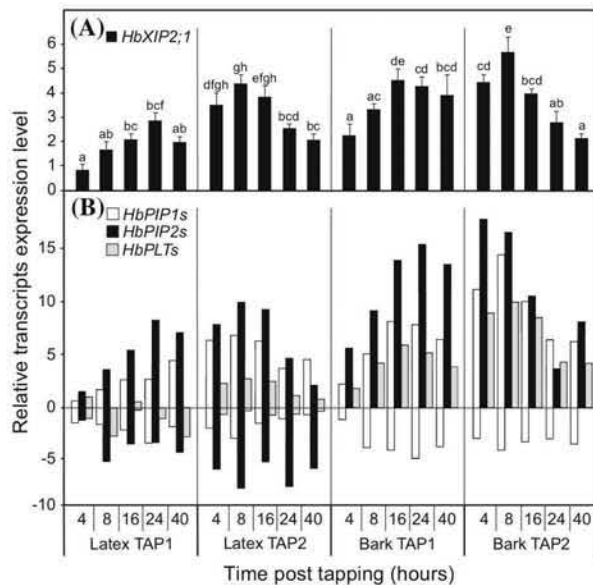


Fig. 8 *HbXIP2;1*, *HbPIPs* and *HbPLTs* gene expressions in tapped rubber tree. Effect of tapping and ethylene treatment on *HbXIP2;1* gene expression (a) compared with *HbPIP1s*, *HbPIP2s* and *HbPLTs* isoforms (b) in latex and bark of exploited *H. brasiliensis* trees (clone PB217). Samples were collected on two successive tapping days (TAP1 and TAP2), from trees treated with ethylene respectively 4, 8, 16, 24 and 40 h before the first tapping. Expression was monitored using real-time quantitative RT-PCR analyses and normalized by the expression of three housekeeping genes (*HbACT*, *HbCYP* and *Hb18S rRNA*). Relative expression rate was obtained by the $E^{-\Delta\Delta C_t}$ method with the untreated samples as controls. Expression rates for each isoform of *HbPIP1s*, *HbPIP2s* and *HbPLTs* are detailed in Supplementary Fig S9. Data correspond to means of three technical repeats from two independent biological experiments, and bars represent the biological standard deviation. XIP data were statistically evaluated using Student's *t* test ($p < 0.001$)

2006). The glycerol metabolic pathway is also crucial for phospholipid biosynthesis with its derivative G3P and dihydroxyacetone phosphate as precursors (Vance 2001). The involvement of primary metabolism in stressed plants is generally underestimated, and yet some studies show that enhanced plant resistance involves a glycerol-triggered enhancement of the G3P pool (Eastmond 2004; Chanda et al. 2008). Interestingly, XIP are sparsely or not expressed in differentiating xylem of poplar and tobacco (Gupta and Sankararamkrishnan 2009; Bienert et al. 2011; Lopez et al. 2012). This is in line with *HbXIP2;1* exhibiting a very low transcriptional expression in mature xylem. Bienert et al. state that *NtXIP1;1* will not ensure solute exchanges within the vascular tissues. This assumption is not in question, but rather it emphasizes interesting features linked to the activity of the laticiferous system in which XIP are strongly expressed, and could play pivotal roles in allowing imports of glycerol and potentially of more hydrophobic solutes. In this regard, we do not exclude the

possibility that these solutes also integrate the rubber biosynthesis pathway. Whether XIP could play this role needs to be investigated directly in plants, a very promising path for future works.

Concluding remarks about XIP and outlook

Although the laticiferous system is structurally unconnected to the parenchyma of surrounding tissues, fluxes do occur through specific regulation between these tissues. It is of interest to understand the fine controls of fluid balance that exist between these specialized tissues and the coordinated regulation of gene families involved in the rubber biosynthesis pathway in latex harvesting contexts. Among the three XIP genes present in *H. brasiliensis* genome, only *HbXIP2;1* was expressed in our physiological conditions. In particular, *HbXIP2;1* is expressed in laticifers cells and modulation in challenged rubber trees remarkably correlates with the kinetics of latex yield. Given the interesting features of *HbXIP2;1* (glycerol channelling, plasma membrane location and tissue distribution), it is legitimate to speculate on its role in the molecular dialogues between the two non-connected cell systems, i.e. the highly specialized laticiferous and the vascular networks. AQP are key players for cell osmoregulation. However, AQP structure and functions remain to be explored, such as specificity of transport and pore gating, given that the pore diameter and charge gradient inference seem to be structurally conserved between *HbXIP2;1* and *SoPIP2;1*. Comparative modeling results have highlighted probable structural checkpoints by which *HbXIP2;1* could regulate substrate diffusion, such as loop D which could play the role of a lid to gate the pore, or an inter-chain disulfide bond that could be part of an allosterical trick to favor cooperativity between the subunits of a tetrameric *HbXIP2;1* during the activity process. Some of our observations described here may guide future research. Glycerol remains an emblematic substrate for all the non-exclusive water-channelling MIP. The predictive protein structure and the functional validation in heterologous system show *HbXIP2;1* as a glyceroporin, possibly with diverse hypothetical biological functions. There is considerable evidence that several channels are permeable to glycerol. However, no physiological function of glycerol-permeable aquaporins *in planta* had been experienced using knockout or loss-of-functions mutants in model plant such as *Arabidopsis*, rice or maize. To make the link between the abilities of *HbXIP2;1* to transport glycerol and to be involved in a transmembrane glycerol transport will require further experimental confirmations. The same would apply to other solutes that XIP is able to transport. Such findings would be crucial for the plant aquaporin research field and for the

whole plant physiology community. While no physiological evidence is given to fully demonstrate XIP-mediated glycerol transport into laticifers, our data provides a first step in studying processes involving XIP during latex harvesting. The physiological roles of XIP and/or glycerol mobilizations in laticifers, and more broadly *in planta*, remain to be clearly demonstrated. If XIP are plasma membrane-localized and participate in glycerol fluxes between cells, how much glycerol could be transiently accumulated in the apoplastic space and then be remobilized as a carbon source? Could glycerol act as a modulator of the osmotic driving forces that adjust the integrity of cells, and therefore for laticifers, regulate the latex metabolism and its gradual outflow? All these questions are hard to answer owing to the lack of appropriate biochemical methodologies to monitor infinitesimal changes in the extra/intracellular accumulation of this small solute. Functional *in planta* analysis should further refine our understanding of the relationship between glycerol metabolism, cell osmo-protection and the functional role of XIP, or other glyceroporins, in latex-producing plants.

Acknowledgments We are in Professor François Chaumont's debt for reading carefully the manuscript and for his constructive remarks that helped us to improve it with relevant arguments. We thank Sylvaine Blateyron for her excellent technical support. This research was supported by the earmarked funds from the PIAF and LBLGC Research Systems. The funders -whatever this may mean- had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We would also like to thank the anonymous reviewers for their constructive comments and encouragement on the article. The authors declare no competing financial interests.

Author Contributions David Lopez co-designed and participated to most of the experiments and wrote the first draft of the article; Jean-Stéphane Venisse, Beatriz Muries and Maroua Ben Amira carried out the gene expression experiments and bioinformatics analysis; Nicole Brunel-Michac carried out and interpreted the *in situ* hybridization experiments; Daniel Auguin performed the *HbXIP2;1* 3D structure modeling and the structural analysis; Sylvain Bourgerie performed water permeability assessment in yeast and the functional complementation of *Dfps1* yeast strain; Benoit Porcheron and Rémy Lemoine performed glycerol permeability; Daniel Brown and Lorenzo Frigerio directed and performed YFP-*HbXIP2;1* construction, agro-infiltration of tobacco and confocal microscopy analysis, and appropriate interpretation; Ewan Mollison and Alessandra Di Cola retrieved full-length *HbXIP* sequences in *H. brasiliensis* genome; Hervé Chrestin provided the latex yield data; Jean-Stéphane Venisse and Boris Fumanal performed and interpreted the phylogenetic analysis; Aurélie Gousset-Dupont, Philippe Label, Valérie Pujade-Renaud and Jean-Louis Julien have ensured a critical examination of the manuscript; Valérie Pujade-Renaud provided plant materials needed for this work; Jean-Stéphane Venisse led the program, co-designed the experiments, obtained the funding, and coordinated and compiled authors' contributions to the final version of the article; Daniel Auguin and Jean-Stéphane Venisse wrote the final draft of the article and edited it; All the authors participated in the analysis of data, and collectively approved whole of the result interpretation and related hypothesis.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abascal F, Irisarri I, Zardoya R (2014) Diversity and evolution of membrane intrinsic protein. *Biochim Biophys Acta* 1840:1468–1481
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- An F, Zou Z, Cai X, Wang J, Rookes J, Lin W, Cahill D, Kong L (2015) Regulation of HbPIP2;3, a latex-abundant water transporter, is associated with latex dilution and yield in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *PLoS one* 10:e0125595
- Anderberg HI, Danielson JAH, Johanson U (2011) Algal MIPs, high diversity and conserved motifs. *BMC Evol Biol* 11:110
- Anderberg HI, Kjellbom P, Johanson U (2012) Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Front Plant Sci* 3:33
- Anderca MI, Suga S, Furuichi T, Shimogawara K, Maeshima M, Muto S (2004) Functional identification of the glycerol transport activity of *Chlamydomonas reinhardtii* CrMIP1. *Plant Cell Physiol* 45:1313–1319
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10037–10041
- Barlowe C (2003) Signals for COPII-dependent export from the ER: What's the ticket out? *Trends Cell Biol* 13:295–300
- Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F (2011) *Solanaceae* XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Plant J* 66:306–317
- Bienert GP, Cavez D, Besserer A, Berny MC, Gilis D, Rooman M, Chaumont F (2012) A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. *Biochem J* 445:101–111
- Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoseck M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M (2009) CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30:1545–1614
- Brunel N, Leduc N, Poupard P, Simoneau P, Mauget JC, Viemont JD (2002) K NAP2, a class I KN1-like gene is a negative marker of bud growth potential in apple tree (*Malus domestica* L. Borkh.). *J Exp Bot* 53:2143–2149
- Chanda B, Venugopal SC, Kulshrestha S, Navarre D, Downie B, Vaillancourt L, Kachroo A, Kachroo P (2008) Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in Arabidopsis. *Plant Physiol* 147:2017–2029
- Chao J, Chen Y, Wu S, Tian WM (2015) Comparative transcriptome analysis of latex from rubber tree clone CATAS8-79 and PR107 reveals new cues for the regulation of latex regeneration and duration of latex flow. *BMC Plant Biol* 15:104
- Chase MW, Reveal JL (2009) A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Bot J Linn Soc* 161:122–127

- Chaumont F, Tyerman SD (2014) Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol* 164:1600–1618
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 97:749–764
- Chen LY (2013) Glycerol modulates water permeation through *Escherichia coli* aquaglyceroporin GlpF. *Biochim Biophys Acta* 1828:1786–1793
- Chen TH, Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5:250–257
- Chen VB, Arendall WB, Head JJ, Immormino RM, Kapral GL, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:12–21
- Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Chisten R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7:439
- Chothia C (1975) Structural invariants in protein folding. *Nature* 254:304–308
- Chow KS, Wan KL, Isa MN, Bahari A, Tan SH, Harikrishna K, Yeang HY (2007) Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex. *J Exp Bot* 58:2429–2440
- Chow KS, Isa MN, Bahari A, Ghazali AK, Alias H, Zainuddin Z, Hoh CC, Wan KL (2012) Metabolic routes affecting rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis* latex. *J Exp Bot* 63:1863–1871
- Cornish K (2001) Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry* 57:1123–1134
- Coupé M, Chrestin H (1989) Physico-chemical and bio-chemical mechanisms of the hormonal (ethylene) stimulation: early biochemical events induced in *Hevea* latex by hormonal bark stimulation. In: d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H (eds) *Physiology of rubber tree latex*. CRC Press Inc., Boca Raton, pp 295–319
- D'Auzac J, Ribaillier D (1969) Ethylene: a new stimulant of latex yield for *Hevea brasiliensis*. *CR Acad Sci D Sci Nat* 268:3046–3049
- D'Auzac J, Jacob JL, Prévôt JC, Clément A, Gallois R (1997) The regulation of cis-polyisoprene production (natural rubber) from *Hevea brasiliensis*. In: Pandalai SG (ed) *Recent research developments in plant physiology*. Research Singpost, Trivandrum, pp 273–332
- Danielson JAH, Johanson U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8:45
- De Fay E, Sanier C, Hebant C (1989) Distribution of plasmodesmata in the phloem of *Hevea brasiliensis* in relation to laticifer loading. *Protoplasma* 149:155–162
- DeLano WL (2004) *PyMOL User's Guide*. DeLano Scientific, San Carlos, p 2004
- Di Giorgio JP, Soto G, Alleva K, Jozefkiewicz C, Amodeo G, Muschietti JP, Ayub ND (2014) Prediction of aquaporin function by integrating evolutionary and functional analyses. *J Membr Biol* 247:107–125
- Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G, Baker NA (2007) PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res* 35:W522–W525
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- Du H, Brender JR, Zhang J, Zhang Y (2015) Protein structure prediction provides comparable performance to crystallographic structures in docking-based virtual screening. *Methods* 71:77–84
- Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Lacoite A, Julien JL, Chrestin H, Sakr S (2009) Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production. *Ann Bot* 104:635–647
- Dusotoit-Coucaud A, Kongsawadworakul P, Maurousset L, Viboonjun U, Brunel N, Pujade-Renaud V, Chrestin H, Sakr S (2010a) Ethylene stimulation of latex yield depends on the expression of a sucrose transporter (HbSUT1B) in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Tree Physiol* 30:1586–1598
- Dusotoit-Coucaud A, Porcheron B, Brunel N, Kongsawadworakul P, Franchel J, Viboonjun U, Chrestin H, Lemoine R, Sakr S (2010b) Cloning and characterization of a new polyol transporter (HbPLT2) in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Physiol* 51:1878–1888
- Dynowski M, Mayer M, Moran O, Ludewig U (2008) Molecular determinants of ammonia and urea conductance in plant aquaporin homologs. *FEBS Lett* 582:2458–2462
- Eastmond PJ (2004) Glycerol-insensitive *Arabidopsis* mutants: gli1 seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. *Plant J* 37:617–625
- Fischer M, Kaldenhoff R (2008) On the pH regulation of plant aquaporin. *J Biol Chem* 283:33889–33892
- Forrest KL, Bhawe M (2008) The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features. *Funct Integr Genomics* 8:115–133
- Frick A, Järvå M, Törnroth-Horsefield S (2013) Structural basis for pH gating of plant aquaporins. *FEBS Lett* 587:989–993
- Froger A, Tallur B, Thomas D, Delamarque C (1998) Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci* 7:1458–1468
- Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M (2000) *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12:393–404
- George N, Somero GN, Yancey PH (2011) Osmolytes and cell-volume regulation: physiological and evolutionary principles. *Handbook of Physiology. Cell Physiol*. doi:10.1002/cphy.cp140110
- Gerber D, Byerrum RU, Gee RW, Tolbert NE (1988) Glycerol concentrations in crop plants. *Plant Sciences* 56:31–38
- Giovanetti M, Balestrini R, Volpe V, Guether M, Straub D, Costa A, Ludewig U, Bonfante P (2012) Two putative aquaporin genes are differentially expressed during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *BMC Plant Biol* 12:186
- Gomes D, Agasse A, Thiebaud P, Delrot S, Geros H, Chaumont F (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta* 6:1213–1228
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
- Gupta AB, Sankaramakrishnan R (2009) Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol* 20:134
- Hagel JM, Yeung EC, Facchini PJ (2008) Got milk? The secret life of laticifers. *Trends Plant Sci* 13:1360–1385
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21:535–553
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:463–499
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42:819–832

- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300–372
- Hove RM, Bhawe M (2011) Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Mol Biol* 75:413–430
- Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W (2008) CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* 29:1859–1865
- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10:451–459
- Johansson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Slovall S, Frayse L, Weig AR, Kjellbom P (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 126:1358–1369
- Lacote R, Gabla O, Obouayeba S, Eschbach JM, Rivano F, Dian K, Gohet E (2010) Long-term effect of ethylene stimulation on the yield of rubber trees is linked to latex cell biochemistry. *Field Crops Res* 115:94–98
- Lagree V, Froger A, Deschamps S, Hubert JF, Delamarche C, Bonnet G, Thomas D, Gouranton J, Pellerin I (1999) Switch from an aquaporin to a glycerol channel by two amino acids substitution. *J Biol Chem* 274:6817–6819
- Li H, Yunxia Qin Y, Xiao X, Tang C (2011) Screening of valid reference genes for real-time RT-PCR data normalization in *Hevea brasiliensis* and expression validation of a sucrose transporter gene HbSUT3. *Plant Sci* 181:132–139
- Li G, Santoni V, Maurel C (2013) Plant Aquaporins: roles in Plant Physiology. *Biochim Biophys Acta* 1840:1574–1582
- Lopez D, Bronner G, Brunel N, Auguin D, Bourgerie S, Brignolas F, Carpin S, Toumaire-Roux C, Maurel C, Fumanal B, Martin F, Sakr S, Label P, Julien JL, Gousset-Dupont A, Venisse JS (2012) Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *J Exp Bot* 63:2217–2230
- Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* 14:1360–1371
- Martins CPS, Pedrosa AM, Du D, Gonçalves LP, Yu Q, Gmitter FG Jr, Costa MGC (2015) Genome-wide characterization and expression analysis of major intrinsic proteins during abiotic and biotic stresses in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). *PLoS one* 10:e0138786
- Meyrial V, Laize V, Gobin R, Ripoche P, Hohmann S, Tacnet F (2001) Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 268:334–343
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin1. *Nature* 407:599–605
- Nishimura N, Balch WE (1996) A Di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277:556–558
- Nyblom M, Frick A, Wang Y, Ekvall M, Hallgren K, Hedfalk K, Neutze R, Tajkhorshid E, Tornroth-Horsefield S (2009) Structural and functional analysis of SoPIP2;1 mutants adds insight into plant aquaporin gating. *J Mol Biol* 387:653–668
- Obouayeba S, Boa D, Jacob JL (1996) Performance of the PB217 *Hevea* clone in Cote d'Ivoire. *Plant Rech Dev* 3:346–354
- Pahlman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L (2001) The yeast glycerol-3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* 276:3555–3563
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:324–349
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ, Campbell BT (2010) Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol* 10:142
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2003–2007
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestKeeper—excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515
- Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, Santoni V (2008) Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of *AtPIP2;1* in response to salt stress. *Mol Proteomic* 7:1019–1030
- Pujade-Renaud V, Clement A, Perrot-Rechenmann C, Prevot JC, Chrestin H, Jacob JL, Guern J (1994) Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. *Plant Physiol* 105:127–132
- Rahman AYA, Usharraj AO, Misra BB, Thottathil GP, Jayasekaran K, Feng Y et al (2013) Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *BMC Genom* 14:75
- Reichow SL, Gonen T (2008) Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: implications for channel regulation. *Structure* 16:1389–1398
- Reichow SL, Clemens DM, Freitas JA, Nemeth-Cahalan KL, Heyden M, Tobias DJ, Hall JE, Gonen T (2013) Allosteric mechanism of water-channel gating by Ca^{2+} -calmodulin. *Nat Struct Mol Biol* 20:1085–1092
- Reuscher S, Akiyama M, Mori C, Aoki K, Shibata D, Shiratake K (2013) Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PLoS one* 8:e79052
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725–738
- Santoni V, Verdoucq L, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C (2006) Methylation of aquaporins in plant membrane. *Biochem J* 400:189–197
- Sato K, Nakano A (2007) Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett* 581:2076–2082
- Secchi F, Maciver B, Zeidel ML, Zwieniecki MA (2009) Functional analysis of putative genes encoding the PIP2 water channel subfamily *Populus trichocarpa*. *Tree Physiol* 29:1467–1477
- Sehnal D, Svobodova V, Varkova R, Berka K, Pravda L, Navratilova V, Banas P, Ionescu CM, Otyepka M, Koca J (2013) MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *J Cheminform* 5:39
- Shen W, Wei Y, Dauk M, Tan Y, Taylor D, Selvaraj G, Zou J (2006) Involvement of glycerol-3-phosphate dehydrogenase ion modulating the NADH/NAD⁺ ratio provides evidence of a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:422–441
- Sookmark U, Pujade-Renaud V, Chrestin H, Lacote R, Naiyanetr C, Seguin M, Romruensukharom P, Narangajavana J (2002) Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. *Plant Cell Physiol* 43:1323–1333
- Soveral G, Madeira A, Loureiro-Dias MC, Moura TF (2007) Water transport in intact yeast cells as assessed by fluorescence self-quenching. *Appl Environ Microbiol* 73:2341–2343
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1:2019–2025

- Sui H, Hana BG, Lee JK, Wallan P, Jap B (2001) structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414:872–878
- Tang CL, Alexov E, Pyle AM, Honig B (2007) Calculation of pKas in RNA: on the structural origins and functional roles of protonated nucleotides. *J Mol Biol* 366:1475–1496
- Tang C, Huang D, Yang J, Liu S, Sakr S, Li H, Zhou Y, Quin Y (2010) The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Cell Environ* 33:1708–1720
- Tang C, Xiao X, Li H, Fan Y, Yang J, Qi J, Li H (2013) Comparative analysis of latex transcriptome reveals putative molecular mechanisms underlying super productivity of *Hevea brasiliensis*. *PLoS one* 8:e75307
- Tangphatsomruang S, Uthapaisanwong P, Sangsrakru D, Chanprasert J, Yoocha T, Jomchai N, Tragoonrun S (2011) Characterization of the complete chloroplast genome of *Hevea brasiliensis* reveals genome rearrangement, RNA editing sites and phylogenetic relationships. *Gene* 475:104–112
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439:688–694
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425:393–397
- Tungngoen K, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Katsuhara M, Brunel N, Sakr S, Narangajavana J, Chrestin H (2009) Involvement of HbPIP2;1 and HbTIP1;1 aquaporins in ethylene stimulation of latex yield through regulation of water exchanges between inner laticifer and latex cells in *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol* 151:843–856
- Tungngoen K, Viboonjun U, Kongsawadworakul P, Katsuhara M, Julien JL, Sakr S, Chrestin H, Narangajavana J (2011) Hormonal treatment of the bark of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) increases latex yield through latex dilution in relation with the differential expression of two aquaporin genes. *J Plant Physiol* 168:253–262
- Tupy J (1985) Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Biol Plant* 27:51–64
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35:W71–W74
- Vance DE (2001) Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (4th edn), vol 8. Elsevier, Amsterdam, pp 205–232
- Venkatesh J, Yu JW, Park SW (2013) Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant Physiol Biochem* 73:392–404
- Venkatesh J, Yu JW, Gastonb D, Park SW (2015) Molecular evolution and functional divergence of X-intrinsic protein genes in plants. *Mol Genet Genomics* 290:443–460
- Wallace IC, Roberts DM (2004) Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol* 135:1059–1068
- Webb B, Sali A (2014) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 1137:1–15
- Wei F, Luo S, Zheng Q, Qiu J, Yang W, Wu M, Xiao X (2015) Transcriptome sequencing and comparative analysis reveal long-term flowing mechanisms in *Hevea brasiliensis* latex. *Gene* 10:153–162
- Weig AR, Jakob C (2000) Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 481:293–298
- Yang Z, Lasker K, Schneidman-Duhovny D, Webb B, Huang CC, Pettersen EF, Goddard TD, Meng EC, Sali A, Ferrin TE (2012) UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. *J Struct Biol* 179:269–278
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12:7–8
- Yue C, Cao H, Wang L, Zhou Y, Hao X, Zeng J, Wang X, Yang Y (2014) Molecular cloning and expression analysis of tea plant aquaporin (AQP) gene family. *Plant Physiol Biochem* 83:65–76
- Zardoya R, Villalba S (2001) A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *J Mol Evol* 52:391–404
- Zardoya R, Ding X, Kitagawa Y, Chrispeels MJ (2002) Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 12:14893–14896
- Zelazny E, Borts JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12359–12364
- Zelazny E, Miecielica U, Borst JW, Hemminga MA, Chaumont F (2009) An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant J* 57:346–355
- Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40
- Zhang DY, Ali Z, Wang CB, Xu L, Yi JX, Xu ZL, Liu XQ, He XL, Huang YH, Khan IA, Trethowan RM, Ma HX (2013) Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in Soybean (*Glycine max* L.). *PLoS one* 8:e56312
- Zhu J, Zhang Z (2009) Ethylene stimulation of latex production in *Hevea brasiliensis*. *Plant Signal Behavior* 4:1072–1074

Plante soumise à de nombreux parasites et ravageurs



Plante soumise à de nombreux parasites et ravageurs



Fusarium solari: agent de la fusariose ou pourriture fusarienne



Proche des pertes très importantes en Tunisie

Solutions de protection de la plante contre la fusariose



Lutte Chimique

Lutte Biologique

Lutte Chimique: Triazole (traitement par pulvérisation)



Efficace à 100%
Cependant

Effet toxique sur l'homme, l'environnement et les animaux
Apparition de résistance des agents phytopathogènes

Lutte Biologique:



Pulvérisation de microorganismes sélectionnés contre plusieurs maladies cryptogamiques sévères

Élimine l'agent phytopathogène
et
stimule la croissance de la plante

Lutte Biologique: emploi d'agents phytoprotecteurs



Trichoderma

Application par pulvérisation
Inoculation des racines de jeunes plants

Élimine l'agent phytopathogène
et
Stimule la croissance de la plante

Présentation de Trichoderma



Tellurique
Endophyte
Mycoparasitaire

Trichoderma harziarum

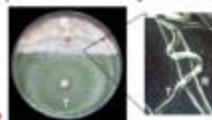
Effets bénéfiques

- Agent de biocontrôle de phytopathogènes
- Echange de nutriments
- Production de métabolites antifongiques
- Stimulation de défenses
- Stimulatrice de la croissance des plantes

Présentation de Trichoderma



Tellurique
Endophyte
Mycoparasitaire



Trichoderma harziarum

A. Confrontation directe entre *Trichoderma* (T) et *Fusarium solani* (F)
B. Vue microscopique de cette confrontation

Effets bénéfiques

- Agent de biocontrôle de phytopathogènes
- Echange de nutriments
- Production de métabolites antifongiques
- Stimulation de défenses
- Stimulatrice de la croissance des plantes

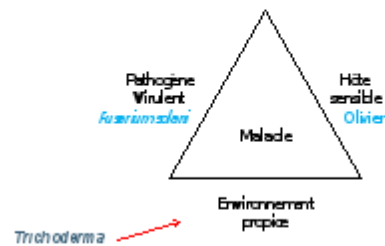
Question:

Trichoderma serait-il un agent de biocontrôle de la fusariose sur l'Olivier?

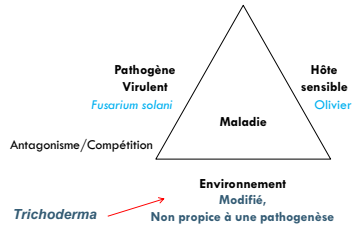
Modèle démontrant les conditions de réussite d'une situation de maladie: « le triangle de la maladie »



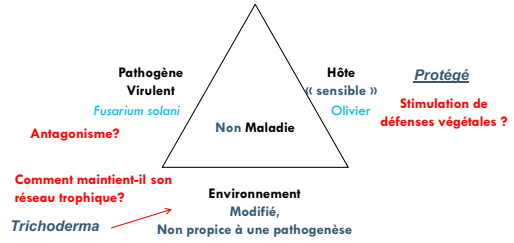
Modèle démontrant les conditions de réussite d'une situation de maladie: « le triangle de la maladie »



Modèle démontrant les conditions de réussite d'une situation de maladie : « le triangle de la maladie »

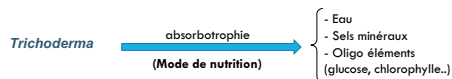
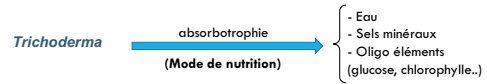


Modèle démontrant les conditions de réussite d'une situation de maladie : « le triangle de la maladie »

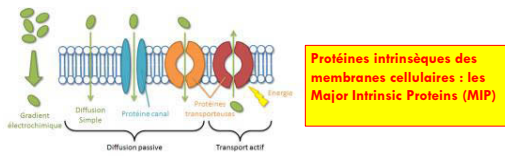


Question :

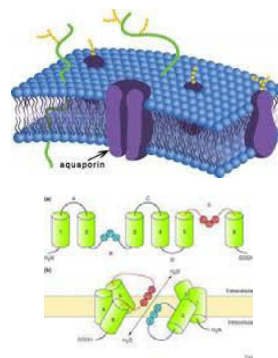
Trichoderma, comment maintient-il son réseau trophique?



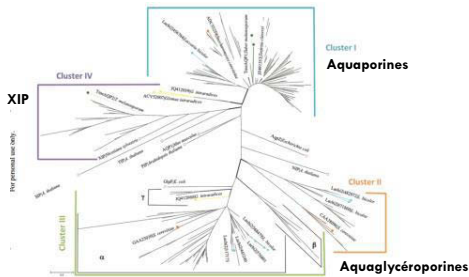
L'absorbotrophie de nutriments extracellulaires obtenus par exodigestion. Ce mode est assuré par des protéines de transport dédiées



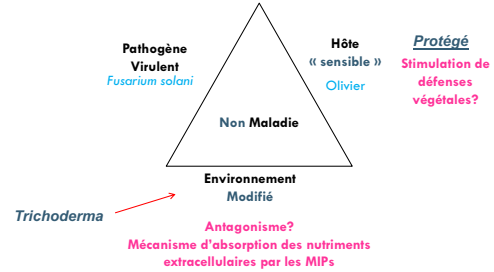
Les MIPs



Les MIPs fongiques



Nos questions de recherche :



- Impact de *T. harzianum* sur la virulence de *F. solani* chez l'Olivier, et dans l'induction des mécanismes de défenses végétales.
 - Implication des MIPs dans l'absorbotrophie de *Trichoderma*, a priori impliquées dans les mécanismes mycoparasitaires.

- Introduction
- Objectifs
- Méthodologies
- Résultats
- Discussions
- Conclusion
- Perspectives

Origine d'Olivier:

Olivier «variété Chemlali» de Sfax

Origine de souche:

Trichoderma harzianum «Ths97»

Fusarium solani «Fso14» (de l'Institut d'Olivier de Sfax (TUNISIE))

Les souches sont préparées dans un milieu PDL avec ajout de déchets de racines d'Olivier.
 Les inoculations ont été réalisées sur les racines de jeunes olivier (par trempage pendant 1h) soit en situation curative (*Fusarium* puis *Trichoderma*), soit préventive (*Trichoderma* puis *Fusarium*)

1.a. Evaluation des niveaux de protection de *T. harzianum*

- Inoculation des jeunes plants d'Olivier par les champignons dans différentes situations
 - Diagnostiquer le niveau de protection de *Trichoderma* (*in planta*)
- Mesure de croissance mycélienne

1.a. Evaluation des niveaux de protection de *T. harzianum*

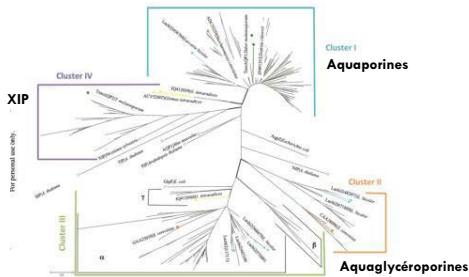
- Inoculation des jeunes plants d'Olivier par les champignons dans différentes situations
 - Diagnostiquer le niveau de protection de *Trichoderma* (*in planta*)
- Mesure de croissance mycélienne

1.b. Suivi des niveaux d'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'immunité fondamentale de plants d'Olivier et potentiellement induits par *T. harzianum*

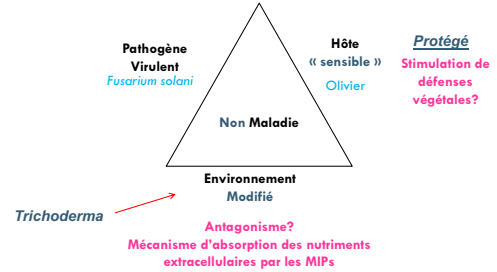
- Expression de plusieurs gènes intégrant différentes voies de défenses végétales : le stress oxydant, la voie des phénylpropanoïdes, des protéines PR, et des enzymes et facteurs de transcriptions impliqués dans les équilibres phytohormonaux de la plante (voie Salicylate/Jasmonate)

RTqPCR

Les MIPs fongiques



Nos questions de recherche :



- Impact de *T. harzianum* sur la virulence de *F. solani* chez l'Olivier, et dans l'induction des mécanismes de défenses végétales.
 - Implication des MIPs dans l'absorbotrophie de *Trichoderma*, a priori impliquées dans les mécanismes mycoparasitaires.

- Introduction
- Objectifs
- Méthodologies
- Résultats
- Discussions
- Conclusion
- Perspectives

Origine d'Olivier:

Olivier «variété Chemlali» de Sfax

Origine de souche:

Trichoderma harzianum «Ths97»

Fusarium solani «Fso14» (de l'Institut d'Olivier de Sfax (TUNISIE))

Les souches sont préparées dans un milieu PDL avec ajout de déchets de racines d'Olivier.
 Les inoculations ont été réalisées sur les racines de jeunes olivier (par trempage pendant 1h) soit en situation curative (*Fusarium* puis *Trichoderma*), soit préventive (*Trichoderma* puis *Fusarium*)

1.a. Evaluation des niveaux de protection de *T. harzianum*

- Inoculation des jeunes plants d'Olivier par les champignons dans différentes situations
- Diagnostiquer le niveau de protection de *Trichoderma* (in planta)
Mesure de croissance mycélienne

1.a. Evaluation des niveaux de protection de *T. harzianum*

- Inoculation des jeunes plants d'Olivier par les champignons dans différentes situations
- Diagnostiquer le niveau de protection de *Trichoderma* (in planta)
Mesure de croissance mycélienne

1.b. Suivi des niveaux d'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'immunité fondamentale de plants d'Olivier et potentiellement induits par *T. harzianum*

- Expression de plusieurs gènes intégrant différentes voies de défenses végétales : le stress oxydant, la voie des phénylpropanoïdes, des protéines PR, et des enzymes et facteurs de transcriptions impliqués dans les équilibres phytohormonaux de la plante (voie Salicylate/Jasmonate)

RTqPCR

1.a. Evaluation des niveaux de protection de *T. harzianum*

- Inoculation des jeunes plants d'olivier par les champignons dans différentes situations

- Diagnostiquer le niveau de protection de *Trichoderma* (*in planta*)

Mesure de croissance mycélienne

1.b. Suivi des niveaux d'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'immunité fondamentale de plants d'Olivier et potentiellement induits par *T. harzianum*

- Expression de plusieurs gènes intégrant différentes voies de défenses végétales : le stress oxydant, la voie des phénylpropanoïdes, des protéines PR, et des enzymes et facteurs de transcriptions impliqués dans les équilibres phytohormonaux de la plante (voie Salicylate/Jasmonate)

RTqPCR

1.c. Décryptage *in vitro* des mécanismes d'attaque que déploierait *T. harzianum* en contact avec *F. solani*

- Compréhension des Mécanismes cellulaires déployés par *Trichoderma* envers son champignon hôte *Fusarium* (test *in vitro*)

Microscopie optique

2.a. Caractérisation *in silico* des MIPs chez *Trichoderma*

Recherche de séquences MIP (NCBI, JGI) par Blast et mot clé «aquaporin»
Alignements et Phylogénie (phylogenie.fr)

2.a. Caractérisation *in silico* des MIPs chez *Trichoderma*

Recherche de séquences MIP (NCBI, JGI) par Blast et mot clé «aquaporin»
Alignements et Phylogénie (phylogenie.fr)

2.b. Evaluation des expressions MIPs chez *Trichoderma* lors d'interaction *in vitro* et *in planta*

RTqPCR

2.a. Caractérisation *in silico* des MIPs chez *Trichoderma*

Recherche de séquences MIP (NCBI, JGI) par Blast et mot clé «aquaporin»
Alignements et Phylogénie (phylogenie.fr)

2.b. Evaluation des expressions MIPs chez *Trichoderma* lors d'interaction *in vitro* et *in planta*

RTqPCR

2.c. Elaboration de la structure tridimensionnelle des MIP chez *Trichoderma* et identification de points de régulation majeurs pouvant prédire certaines activités perméase vis-à-vis de certaines molécules (eau, glycérol, polyols)

Simulation moléculaire
Collaboration avec Dr AUGIN université d'Orléans

• Introduction

• Objectifs

• Méthodologies

• Résultats

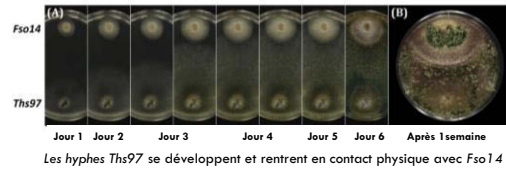
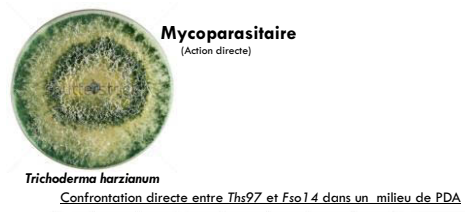
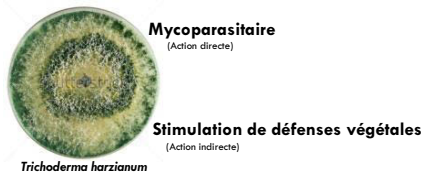
• Discussions

• Conclusion

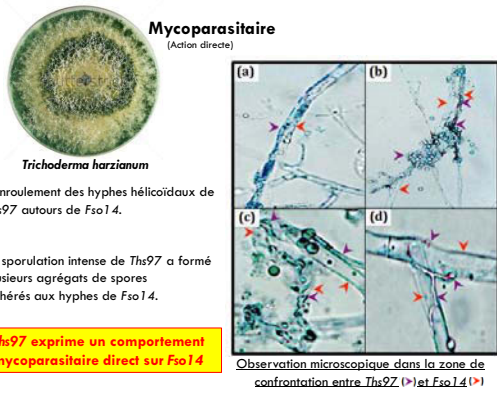
• Perspectives



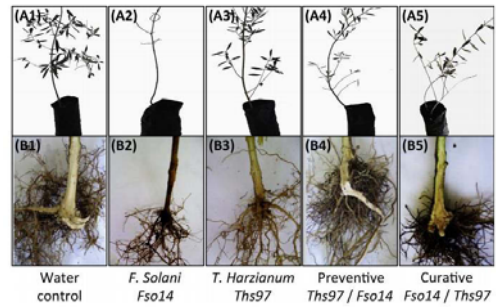
Question*1 *T. harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *F. solani* chez l'Olivier ?



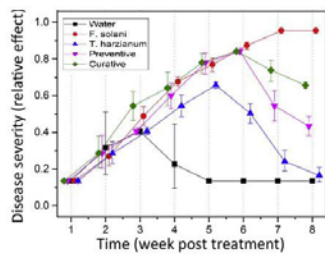
Ths97 inhibe la croissance mycélienne de Fso14



Photos des Oliviers inoculés avec les champignons (Après 2 mois d'inoculation)

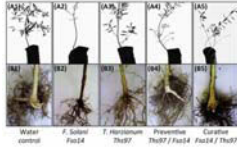


Sévérité de la maladie



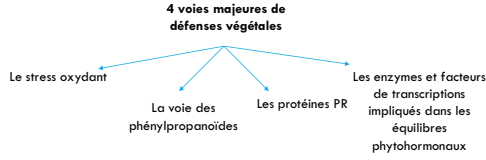
Ths97 protège significativement l'Olivier contre Fso14 dans les situations préventive et curative



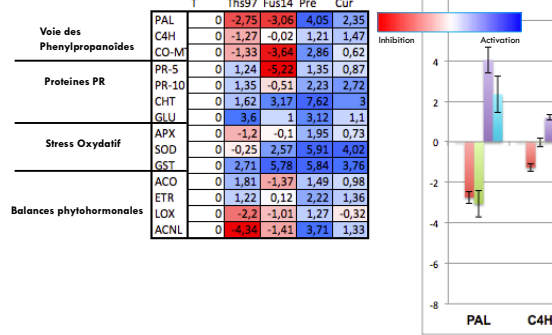


Stimulation de défenses végétales (feuilles)

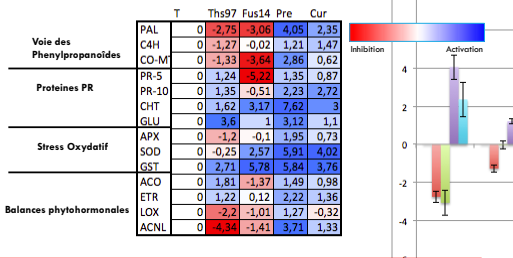
Induit la résistance systémique induite (ISR)



La modulation de gènes codant des protéines enzymatiques impliquées dans quatre voies majeures de défense chez l'Olivier



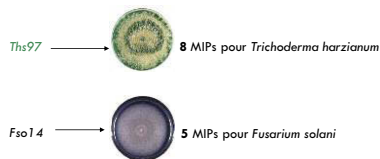
La modulation de gènes codant des protéines enzymatiques impliquées dans quatre voies majeures de défense chez l'Olivier



- *Ths97* stimule systématiquement l'activité des gènes de défense.
- *Fso14* tend à les inhiber.
- Activations générales, fortes et significatives des expressions en situation de co-inoculation

Question*2 Les perméases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de *T. harzianum* ?

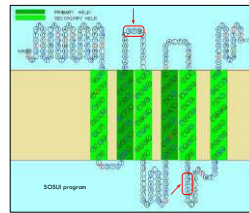
Les MIPs chez et *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)



Prédiction structurelle protéique des MIP de *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)

XIP *Trichoderma harzianum*

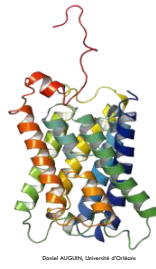
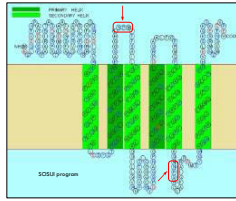
MESLQKTHPAGDGSPPAARISTASDGRPATSKMDLAAFQGSFAPGVRFPAVRLTP
WYRRRDYFVGWVVDISVWKSAYVEFVATSLCLVLSGQITALESYQTPQVGGYI
GNSNLIATHYATAPASGPHBZZMTPSALTGLCSVPRGLYWCAGITLGGALAGGL
LGVYVGRKRATSLQGGCCWYDPSQANPQGIYENRYSRFLLELRFQVGLDPRQ
AALEFPRMPLLVGASLGLVSFSGIPIFYAGAQVNEISRCFLAFGIARRDMTYQV
VWVFGPAVGLMMGFYVLPHPHVELSKQKSKESRMSMAGNTEVPEV*



Prediction structurelle proteique des MIP de *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)

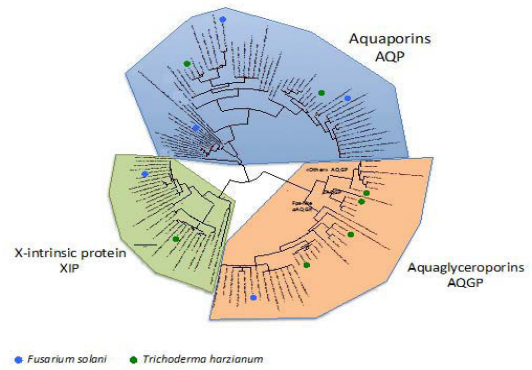
XIP *Trichoderma harzianum*

```
MESLQKTHPAGDGGSPFAARISTASDQRPAITSKMDLAAFDGSAFQVYRPGAVELTP
WYERSDYFPGQVVDISVYKSAVYFVATSCVLSGQITALEYQITQVGGYI
GNSNLIATFYATAPASGGHNPMTFSAITLGLCSVPRGLYVCAQDTLGGALAGLIL
LGVWVWPKRATSLQGGGCVYDPSQANPQIYLVNFASFVLLFLSFGVGLDPRQ
AALFGPRMGPLLVGASLGLVSPATSGIIPG YAGAGMQLZPCLAPGAPRDWITYQW
VWVWFGVAVGCLMAGFVYVLPFRHVEVSKQKRESVNSMAKGTETVSY*
```

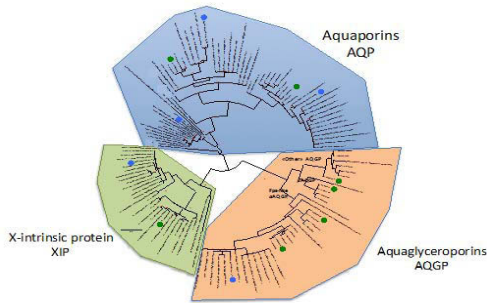


Les 8 sequences de *Trichoderma* et les 5 de *Fusarium* sont des MIPs

Diversite des MIPs chez *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)



Diversite des MIPs chez *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)



Trichoderma et *Fusarium* presentent des MIPs qui se repartissent entre AQP, AQGP et des XIP

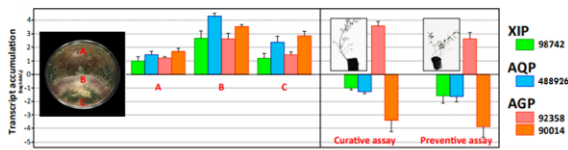
Profil d'expression MIP *in vitro* et chez l'Olivier

- Sur les 8 MIPs chez *Ths97*, 4 membres sont transcrits
- 1 XIP
- 1 AQP
- 2 AGP

Profil d'expression MIP *in vitro* et chez l'Olivier

- Sur les 8 MIPs chez *Ths97*, 4 membres sont transcrits
- 1 XIP
- 1 AQP
- 2 AGP

- Expression modulee en fonction des conditions biologiques dans lesquelles *Ths97* se developpe



4 MIPs participeraient dans le reseau trophique

Etude des cis regulateurs des promoteurs *in silico*



	XIP 488926	AQP 98742	AQGP 92358	AQGP 90014
Carbon and nitrogen metabolic processes	77%	62%	81%	64%
Phosphate transport and metabolic processes				
Cellular cation homeostasis / xenobiotic transport	0,04%	0,04%	0,05%	0,04%
Cellular response to osmotic stress				
Cellular response to stress				
Cellular response to oxidative stress				

Très forte representativite des motifs cis-regulateurs regules par des sources carbonées, azotées et phosphorées

- Introduction
- Objectifs
- Méthodologies
- Résultats
- Discussions
- Conclusion
- Perspectives



1^{re} question : *T. litorale* a-t-elle un impact sur la virulence de *F. solani* chez l'Olivier

résumé	

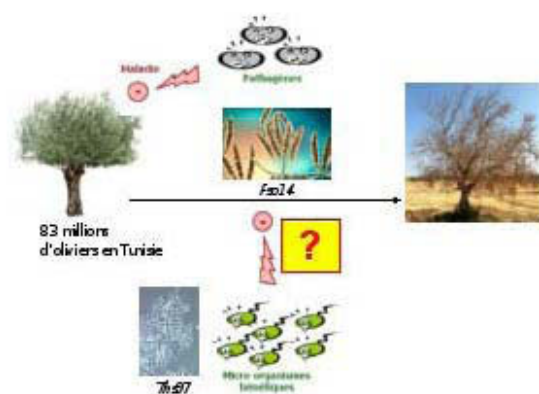
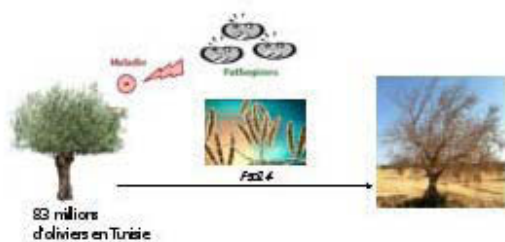
Th67 est un sérieux candidat pour la lutte biologique contre la fusariose sur l'Olivier.

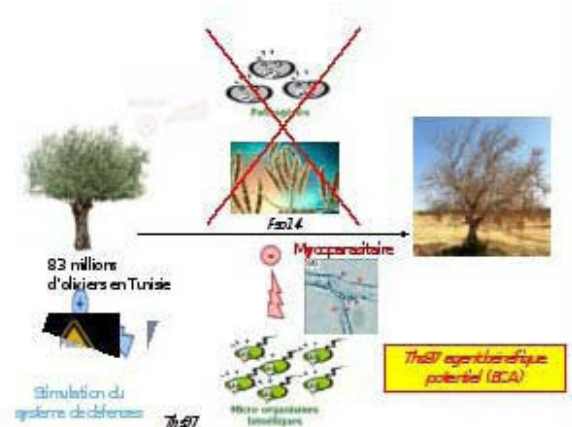
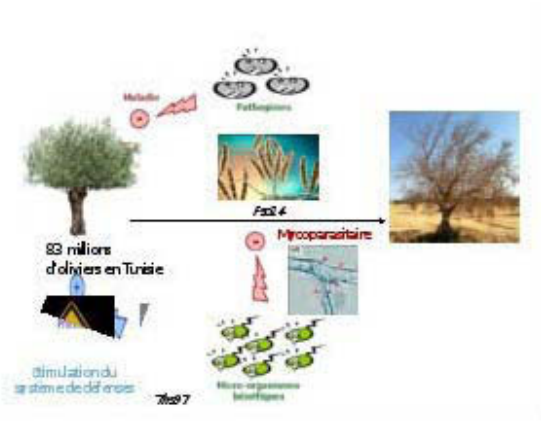
2^{ème} question : Les perméases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de *T. litorale*?

structure	
à par la	

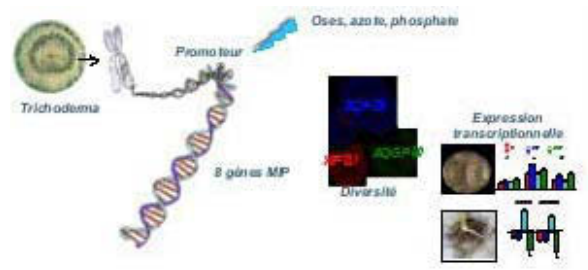
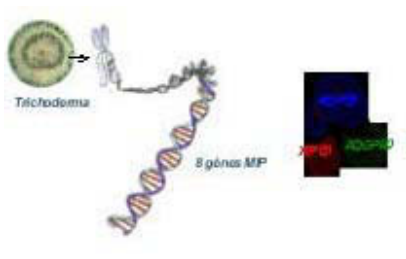
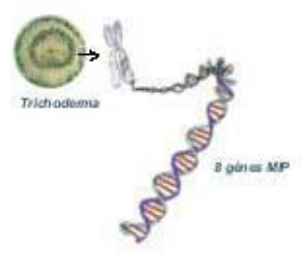
Les MIPs seraient de sérieux candidats à utiliser pour explorer les réseaux trophiques de *Triphodema*, et pourraient être impliqués dans son pouvoir mycoparasitaire envers « ses hôtes ».

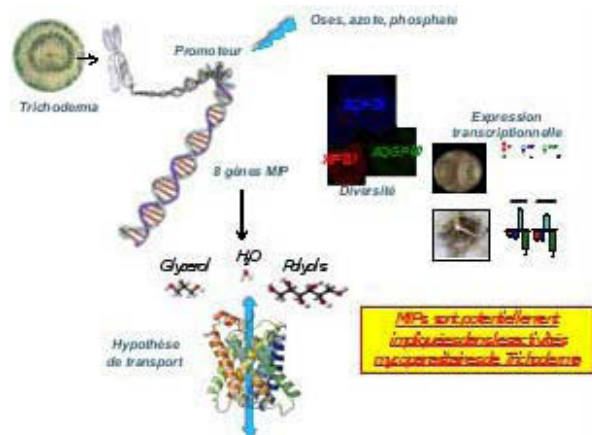
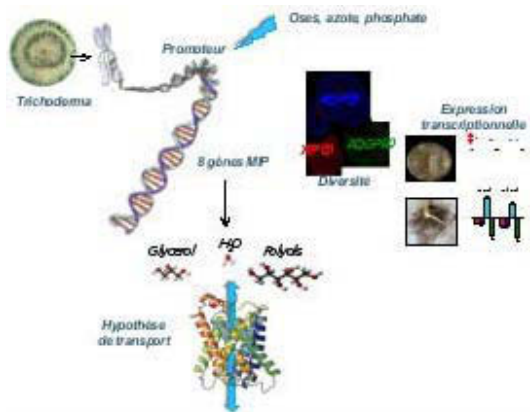
- Introduction
- Objectifs
- Méthodologies
- Résultats
- Discussions
- Conclusion
- Perspectives






2^{ème} question : Les protéases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma* ?

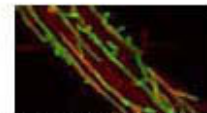




- Introduction
 - Objectifs
 - Méthodologies
 - Résultats
 - Discussions
 - Conclusion
 - Perspectives
- 



Identifier chez *T. s97* les mycotoxines qui participeraient aux mécanismes antagonistes (antibiose)



Évaluer les mécanismes et lieux d'installation de *T. s97* au niveau racinaire chez l'Olivier
Identifier les éliciteurs déployés par *T. s97*, modulateurs des défenses végétales



Appréier la potentialisation de croissance de plants d'Olivier et leur potentiel de production par *T. s97*



Identifier les perméants et leur origine (hôtes ?) transportés par les MP es primés en situation de mycorrhizisme



7

Chapitre



Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

- A -

- AESA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Vitamin C (L-Ascorbic acid, its calcium, potassium and sodium salts and L-ascorbyl-6-palmitate), The Efsa journal, 59, http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/opinion_nda_06_ej59_vitc_en1,2.pdf.
- Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., Nielsen, S., 2002. Aquaporin water channels from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542: 3-16.
- Agrios G.N., 2005. *Plant Pathology*, 5th Edition, Elsevier Acad. Press, pp163-164.
- Ahmadpour, D., Geijer, C., Tamás, M.J., Lindkvist-Petersson, K., Hohmann, S., 2014. Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *Biochim. Biophys. Acta* 1840:1482-1491.
- Alabouvette, C., 2004. Les méthodes de protection des plantes alternatives à la lutte chimique. Académie d'Agriculture de France, 2p.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Steinberg, C., 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology* 114:329-341.
- Al-Ahmed, M., Hamidi, M., 1984. Decline of olive trees in southern Syria. *Arab Journal of Plant Protection* 2:70-76.
- Alba Juan, M., Glas Joris, J., Schimmel, C.J., Kant Merijn, R., 2011. Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens. *Journal of Plant Interactions* 4:221-227.
- Alfano, J.R., Collmer, A., 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:358-414.
- Altinok, H., Erdogan, O., 2015. Determination of the *In vitro* Effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Not Bot Horti Agrobo.* 43:494-500.
- Amini J., Sidovich D.F., 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *J. Plant Prot. Res.* 50:172-178.
- Andrabi, M., Vaid, A., Razdan, V.K., 2011. Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. *J Plant Prot. Res.* 51:5-59.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 98:411-421.
- Avasthi, S., Gautam, A.K., Bhadauria, R., 2010. Antifungal activity of plant products against *Aspergillus niger*: a potential application in the control of a spoilage fungus. *Biological Forum* 2:53-55.
- Avis, T.J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizospheremicroorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol Biochem.* 40:1733-1740.

- B -

- Baker, N., Glover, L., Munday, J. C., Aguinaga Andres, D., Barrett, M. P., De Koning, H. P., Horn, D., 2012. Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:10996-11001.
- Balajee, S.A. Borman, A.M., Brandt, M.E., Cano, J., Cuenca-Estrella, M., et al., 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol*, 47:877-884.
- Beckers, G.J.M., Conrath, U., 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr Opin Plant Biol* 10:425-431.
- Beckman, C.H., Roberts, E.M., 1995. On the nature genetic basis for resistance tolerance of fungal wilt diseases. *Advances in Botanical Research*, 21:35-77.
- Beitz, E., 2005. Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol. Cell* 97:373-383.
- Belabid, L., 2003. La fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med.) dans le Nord-Ouest Algérien : Morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. S. & H. f. sp. *lentis* (Vasud. & Srini.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.

Références Bibliographies

- Benhamou, N., Chet, I.**, 1997 Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2095-2099.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol.* 7:249-260.
- Benizri, E., Baudoin, E., Guckert, A., 2001. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci Technol* 11:557-574.
- Bissett, J., 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany.* 69:2357-2372.
- Blaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., Jedryczka, M., 2014 *Trichoderma* spp. application and prospects for use in organic farming and industry. *J Plant Prot Res*, 54: 309–317.
- Boulila, M., 1994. Le dépérissement de l'olivier en Tunisie: premiers résultats de recherche et perspectives d'avenir. 7èmes journées biologiques. Soc. Chimie biologique. Tunisie. 7p.
- Boulila, M., 2001. Maladies de l'Olivier en Tunisie : connaissances actuelles. *Olivae* 85 :22-25.
- Boulila, M., 2011. Current knowledge on major disorders of olive in Tunisia. *Revue Ezzaitouna* 12.
- Bourguignon, E., 2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. Ph.D.Thesis. Lincoln University, Canterbury, New Zealand. pp235.
- Bouzoumita, A., Rhouma, A., Belhouchette, K., Ferchichi, A., 2016. Etude de la sensibilité variétale de quelques plans d'olivier du sud Tunisien vis-à-vis la maladie de dépérissement causé par des champignons telluriques. *Journal of New Sciences.* 27:01.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A., Pickett, J.A., 2007. Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* 173:603-608.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C.P., Mach, R.L., 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl Environ Microbiol* 71:3959-3965.

- C -

- Carvalho, D.D.C., Junior, M.L., Martins, I., Inglis, P.W., Mello, S.C.M., 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use of common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology* 39:384-391.
- Castle, N.A., 2005. Aquaporins as targets for drug discovery. *Drug Disc Today.* 10:485-493.
- Chanclud, E., Morel, J.B., 2016. Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular Plant Pathology.* DOI: 10.1111/mpp.12393.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A., Overton, B.E., Samuels, G.J., 2003a. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* 95:1100-1140.
- Chaverri P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J., Geiser, D.M., 2003b. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:302-313.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W.M., Gazis, R.O., Degenkolb, T., Samuels, G.J., 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107:558-590.
- Chet, I., 1993. *Biotechnology in plant disease control.* Wiley & Sons, New York, 373 pp.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., et al., 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:1062-1071.
- Curl, E.A., Truelove, B., 1986. *The rhizosphere advanced series in agriculture sciences.* Springer-verlag Berlin Heidelberg, 288 p.

- D -

- Danielson, J.A., Johanson, U., 2008. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8:45.
- De Castro, A.M., Ferreira, M.C., Da Cruz, J.C., Pedro, K.C.N.R., Carvalho, D.F., Leite, S.G.F., Pereira, Jr.N., 2010. High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Res* 1:1-8.

Références Bibliographies

- De Hoog, G.S., Vicente, V.A., Najafzadeh, M.J., Harrak, M.J., Badali, H., 2011. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Persoonia*. 27:46-72.
- Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species-group of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society*. 57:35-39.
- Dietz, S., Von Bülow, J., Beitz, E., Nehls, U., 2011. The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. *New Phytol*. 190:927-940.
- Dignani, M.C., and Anaissie, E., 2004. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect*.10:67-75.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., and Kubicek, C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol*. 9:749-759.
- Dubey, S.C., Suresh, M., Singh, B., 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biol. Control* 40:118-127.

- E -

- Edel, V., Steinberg, C., Avelange, I., Laguerre, G., Alabouvette, C., 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579-585.
- Edel-Hermann, V., Brenot, S., Gautheron, N., Aime, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., 2009. Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on the soil microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 68:37-45.
- EFSA., 2004a. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *EFSA J*. 73:1-41.
- EFSA., 2004b. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA J*. 89: 1-35.
- Elad, Y., 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *Eur J Plant Pathol* 102:719-732.
- Enkerli, J., Felix, G., Boller, T., 1999. Elicitor activity of fungal xylanase does not depend on enzymatic activity. *Plant Physiol* 121:391-398.
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S. Sahin, F., 2002. Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu 142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum* blight) of apricot. *Gartenbauwissenschaft*. 67:139-142.
- Esposito, E., Silva, M., 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol*. 24:89-98.
- Eziashi, E.I., Uma, N.U., Adekunle, A.A., Airede, C.E., 2006. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *Afr J Biotechnol* 5:703-706.

- F -

- Fadiel, A., Isokpehi, R. D., Stambouli, N., Hamza, A., Benammar-Elgaaied, A. Scalise, T.J., 2009. Protozoan parasite aquaporins. *Expert Rev. Proteomics* 6:199-211.
- Fajardo López, M, Dietz, S, Grunze, N, Bloschies, J, Weiß, M, Nehls, U., 2008. The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil growing hyphae. *New Phytologist* 180:365-378.
- Feinberg, B., McLaughlin, C.S., 1989. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V.R. (Ed.), *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological Effects*, vol. I. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp.27-35.
- Fernanda, P., Gamble, W.T., Guarino, R., Miguel, C., Rodrigues, T., Jack, W., Sites, J.R., 2012. Deep diversification and longterm persistence in the south american 'dry diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *The Society for the Study of Evolution. Evolution* 66:3014-3034.
- Forde, S.E., Thompson, J.N., Bohannon, B.J.M., 2004. Adaptation varies through space and time in a coevolving host-parasitoid interaction. *Nature* 431:841-844.
- Foury, C., 1995. Quelques aspects de la désinfection solaire des sols. *PHM* 3356:15-20.
- Frederix, M.J.J., Den Brader, K., 1989. Résultats des essais de désinfection des sols contenant des

Références Bibliographies

échantillons de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. FAO/PNUD/ RAB/88/024. Ghardaia, Algérie.

- G -

- Gagné, S., 1984. Bactéries telluriques et rhizosphériques inhibitrices de certains champignons phytopathogènes, perspective de lutte biologique chez la luzerne. Mémoire de maîtrise, Université Laval, 62 p.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., Golakiya, B., 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 1:133-142.
- Gams, W., Bissett, J., 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E., editors. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd. pp.3-34.
- Gams, W., Diederich, P., Poldamaa, K., 2004. Fungicolous fungi. In Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds), *Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, pp.343-392.
- Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W., et al., 2013. One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology* 103:400-408.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., Rey, P., 2013a. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Env Sci Poll Res* 11:14-19.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., Rey, P., 2013b. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21,4847-4860.
- Gharbi, I., Issaoui, M., Hammami, M., 2014. La filière oléagineuse en Afrique. Published by EDP Sciences. OCL, 21, D202.
- Gherbawy Y., Druzhinina I., Shaban G.M., Wuczkowsky M., Yaser M., El-Naghy M.A., Prillinger H., Kubicek C.P., 2004. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycol. Prog* 3:211-218.
- Graf FE, Ludin P, Wenzler T, Kaiser M, Brun R, Pyana PP, Buscher P, de Koning HP, Horn D, Maser P., 2013. Aquaporin 2 mutations in *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates correlate with decreased susceptibility to pentamidine and melarsoprol. *PLoS Neg Trop Dis* 7:e2475.
- Gravel, V., Antoun, V., Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem* 39:1968-1977.
- Green, P.S., Wickens, G.E., 1989. The *Olea europaea* complex. In: Tan K, Mill RR, Elias TS, editors. *The Davis and Hedge Festschrift*. Edinburgh: Edinburgh University Press; pp.287-299.
- Gupta, A.B., Sankararamkrishnan, R., 2009. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa* : characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol.* 9:134.

- H -

- Hansen, M., Kun, J. F., Schultz, J. E., Beitz, E., 2002. A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J. Biol. Chem.* 277:4874-4882.
- Harman, G. E., Bjorkman, T., 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Kubicek, C.K., Harman, G.E., editors. *Trichoderma and Gliocladium*. London, England: Taylor and Francis; pp. 229-265.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* spp. - opportunistic avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiology* 2:43-56.
- Hase, S., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. Pieterse, C.M.J., 2003. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:219-226.
- Hedfalk, K., Törnroth-Horsefield, S., Nyblom, M., Johanson, U., Kjellbom, P., Neutze, R., 2006) Aquaporin gating. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:447-456.

Références Bibliographies

- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E., 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.
- Heymann, J.B., Müller, D.J., Landau, E., Rosenbusch, J., Pebay-Peroulla, E., Büldt, G., Engel, A., 1999) Charting the surfaces of the purple membrane. *J. Struct. Biol.* 128:243-249.
- Hibar, K., Mejda, D.R., Haifa, K., Mohamed, E., 2005. Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporium* f. sp. *radicis lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 9: 163-171.
- Hohmann, I., Bill, R.M., Kayingo, I., Prior, B.A., 2000. Microbial MIP channels. *Trends in Microbiology* 8:33-38.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.

-I-

- Inbar, J., Menendez, A., Chet, I., 1996. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* 26:757-763.
- Isokpehi, R.D., Rajnarayanan, R.V., Jeffries, C.D., Oyeleye, T.O., Cohly, H.H., 2009. Integrative sequence and tissue expression profiling of chicken and mammalian aquaporins. *BMC Genomics* 10, S7.

-J-

- Jardak, T., Triki, M.A., Rhouma, A., Ksantini, M., 2007. Protection phytosanitaire. In : Techniques de protection en oléiculture. Tombesi, A., Tombesi, S., Saavedra, M. S., Fernandez-Escobar, R., Sbitri, M.O., Serafini, F., Andria, R., Lavini, A., et Jardak, T., Conseil oléicole international, Madrid, 215-310.
- Jeffries, P., 1995. *Biology and ecology of mycoparasitism. Canadian Journal of Botany (Supplement)*, 73:S1284-S1290.
- Jelen, H., Błaszczuk, L., Chełkowski, J., Rogowicz, K., Strakowska, J., 2013. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol. Prog*, 13:589-600.
- Jung, J.S., Bhat, R.V., Preston, G.M., Guggino, W.B., Baraban, J.M., Agre, P., 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:13052-13056.

-K-

- Kerry, B.R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38:423-441.
- Kim, M.S., Kim Y.C., Cho, B.H., 2004. Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biol.* 6:105-108.
- Klein, K.K., Correll, J.C., 2001. Vegetative compatibility group diversity in *Fusarium*. In Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L. and Burgess, L.W. (Eds). *Fusarium*, Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press: St. Paul, MN, USA. pp. 83-96.
- Kojima, H1., Hossain, M.M., Kubota, M., Hyakumachi, M., 2013. Involvement of the salicylic acid signaling pathway in the systemic resistance induced in *Arabidopsis* by plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* GF19-1. *J Oleo Sci.* 62:415-26.
- Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 359:1135-1144.
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Druzhinina, I., 2014. Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. In: Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M.G., editors. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. London: Elsevier, pp. 3-24.
- Kubicek, C.P., Starr, T.L., Glass, N.L., 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 52:427-45.

Références Bibliographies

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. Regul. Toxicol. Pharmacol. 7:253-306.

- L -

- Lafferty, K.D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C.J., de Leo, G., Dobson, A.P., Dunne, J.A., Johnson, et al., 2008. Parasites in food webs: the ultimate missing links. Ecol. Letters 11:533-546.
- Lamy Krafft, P., Roquebert, M.F., 1981.** Analyse des interactions entre deux champignons antagonistes : *Trichoderma viride* Pers. et *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. Études préliminaires. Cryptogam. Mycol. 2:137-151.
- Laverdière, L., Lacroix, M., 2008. Flétrissement et dépérissement de la tomate de serre. Quebec. Atlas des maladies feuillet n°P-4.
- Larone, D. H., 1995. Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Lee, J.P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jung, S.J., Moon, B.J., 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Biol. Control. 37:329-337.
- Leuchtmann, A., Petrini, O., Samuels, G., 1996. Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. Mycologia 88:384-394
- Li, Y., Wu, Z., Ma, N., Gao, J., 2009. Regulation of the rose Rh-PIP2;1 promoter by hormones and abiotic stresses in Arabidopsis. Plant Cell Rep. 28:185-196.
- Li, C., Shao, J., Wang, Y., Li, W., Guo, D., Yan, B., Xia, Y., Peng, M., 2013a. Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. BMC Genomics 14: 851.
- Li, T., Hu, Y.J., Hao, Z.P., Li, H., Chen, B.D., 2013b. Aquaporin genes *GintAQPF1* and *GintAQPF2* from *Glomus intraradices* contribute to plant drought tolerance. Plant Signal Behav 8: e24030.

- Liu, X.D., Wei, Y., Zhou, X.Y., Pei, X., Zhang, S.H., 2015. *Aspergillus glaucus* aquaglyceroporin gene *glpF* confers high osmosis tolerance in heterologous organisms. Appl Environ Microbiol 81:6926-6937.
- Lopez, D., Bronner, G., Brunel, N., Auguin, D., Bourgerie, S., Brignolas, F., **Carpin, S.**, Tournaire-Roux, C., Maurel, C., Fumanal, B., Martin, F., Sakr, S., Label, P., Julien, J.L., Gousset-Dupont, A., Venisse, J.S., 2012. Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. Journal of Experimental Botany 63: 2217-2230.
- Lopez D, Venisse JS, Fumanal B, Chaumont F, Guillot E, Daniels MJ, Clochard H, Julien JL and Gousset-Dupont A, 2013. Aquaporins and Leaf Hydraulics: Poplar Sheds New Light Plant Cell Physiol. 54:1963-1975.
- Lopez, D., Ben Amira, M., Brown, D., Muries, B., Brunel-Michac, N., Bourgerie, S., Porcheron, B., Lemoine, R., Chrestin, H., Mollison, E., Di Cola, A., Frigerio, L., Julien, J.L., Gousset, A., Fumanal, B., Label, P., Pujade-Renaud, V., Auguin, D., Venise, J.S., 2016. The *Hevea brasiliensis* XIP aquaporin subfamily: Genomic, structural and functional characterizations with relevance to intensive latex harvesting. Plant Molecular Biology 91:375-96.
- Lopez-Pascua, L.D.C., Brockhurst, M.A., Buckling, A., 2010. Antagonistic coevolution across productivity gradients: an experimental test of the effects of dispersal. J Evol Biol; 23: 207-211.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A., Santos, C., 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry, Genetic Resources and Crop Evolution, Vol. 54, No.1, pp. 21–25. ISSN 1573-5109.
- Lucic, E., Fourrey, C., Kohler, A., Martin, F., Chalot, M., Brun-Jacob, A., 2008. A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. New Phytologist 180: 343-364.

- M -

- Ma, L-J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D.M., Manners, J.M., Kazan, K., 2013. *Fusarium* pathogenomics. Annu. Rev. Microbiol. 67:399-416.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C.M., Pozo, M.J., Ton, J., van Dam,

Références Bibliographies

- N.M., Conrath, U., 2016. Recognizing Plant Defense Priming. *Trends Plant Sci.* 21:818-822.
- McSpadden Gardener, B.B., Fravel, D.R., 2002. Biological control of plant pathogens: research, commercialization and application in the USA. *Online Plant Health Progress*. doi:10.1094/ PHP-2002-0510-01-RV.
- Meincke, R., Weinert, N., Radl, V., Schloter, M., Smalla, K., Berg, G., 2010. Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. *J Microbiol Methods* 80:63-69.
- Metcalfe, D.D., Wilson, C.C., 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology* 50:249-257.
- Miguel, A., Maroto, J.V., San Bautista, A., Baixauli, C., Cebolla, V., Pascual, B., Lopez-Galarza, S., Guardiola, J.L., 2004. The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of *Fusarium* wilt. *Sci. Hortic.* 103:9-17.
- Mims, C.W., Hanlin, R.T., Richardson, E.A., 2007. Light- and electron-microscopic observations of *Cladosporium* sp. growing on basidia of *Exobasidium camelliae* var. *gracilis*. *Canadian Journal of Botany* 85:76.
- Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Zhao, F.J., Ma, J.F., 2011. The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. *J Exp Bot* 62:4391-4398.

- N -

- Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A., Hossain, K., 2014. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pak J Bot.* 46:1489-1493.
- Naseby, D.C., Pascual, J.A., Lynch, J.M., 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. Appl. Microbiol.* 88:161-169.
- Nasraoui, B., 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre de Publication Universitaire, Tunisie, 456 p.
- Navarro-RóDenas, A., Xu, H., Kemppainen, M., Pardo, A.G., Zwiazek, J.J., 2015. *Laccaria bicolor* aquaporin LbAQP1 is required for Hartig net development in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant, Cell & Environment* 38:2475-2486.
- Nehls, U., Dietz, S., 2014. Fungal aquaporins: cellular functions and ecophysiological perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8835-8851.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J., 1981. *Fusarium*, Diseases, Biology, and Taxonomy. University Park and London, U.S.A. The Pennsylvania State University Press. 457pp.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, 193.
- NRC Report., 1996. Ecologically Based Pest Management: New Solutions for a New Century, 144 pp. Natl. Acad. Sci. Press.

- O -

- O'Donnell, K., Ward, T.J., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Geiser, D.M., Kang, S., 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43:583-595.
- Oliveira, R., Lages, F., Silva-Graca, M., Lucas, C., 2003. Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochim. Biophys. Acta* 1613:57-71.
- ONH: Office national de l'huile, 2015. <http://www.onh.com.tn/index.php/fr/l-olivier>.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111:38-43.
- Osburn, R.M., Milner, J.L., Oplinger, E.S., Smith, R.S. and Handelsman, J., 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. *Plant Dis.* 79:551-556.

Références Bibliographies

- P -

- Paster, N., Barkai-Golan, R., 2008. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal* 1:385-396.
- Perazzolli, M., Moretto, M., Fontana, P., Ferrarini, A., Velasco, R., Moser, C., Delledonne, M., Pertot, I., 2012. Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevine especially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics* 13:660.
- Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E., Pertot, I., 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biol. Control* 58, 74-82.
- Pettersson, N., Filipsson, C., Becit, E., Brive, L., Hohmann, S., 2005. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol. Cell* 97:487-500.
- Pieterse, C.M.J., Ton, J. Van Loon, L.C., 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet*. 3: ABN 068.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Ton, J., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., 2002. Signaling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 4:535-544.
- Pitt, J.I. (2000) Toxigenic fungi: which are important? *Med. Mycol.* 38: 17–22.
- Placinta, C.M., D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feeds with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78 :21–37.
- Porrás Soriano, A., Soriano Martín, M.L., Porrás Piedra, A., 2003. Grafting olive cv. Cornicabra on rootstocks tolerant to *Verticillium dahliae* reduces their susceptibility. *CROP PROTECTION* 22 :369-374.

- R -

- Raja, N., 2014. Botanicals: sources for eco-friendly biopesticides. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides* 5: 1.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect.* 20:1-11.
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernandez-Galan, R., Collado, I.G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry* 7:89-123.
- Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G., Paull, R.E., 2004. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33:193-203.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J., 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* 48,1-34.
- Rugini, E., De Pace, C., Gutiérrez-Pesce, P., Muleo, R., 2011. Olea. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits*, Chittaranjan Kole (Ed.), pp79-114.
- Ruiz-Palmero I., Simon-Areces J., Garcia-Segura L. M., Arevalo M. A., 2011. Notch/neurogenin 3 signalling is involved in the neurotogenic actions of oestradiol in developing hippocampal neurones. *J. Neuroendocrinol.* 23:3635–36410.

- S -

- Saier, M.H., Reddy, V.S., Tsu, B.V., Ahmed, M.S., Li, C., Moreno-Hagelsieb, G., 2016. The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Res.* 4:D372-D379.
- Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* 131:15-26.
- Salvaudon, L., Giraud, T., Shykoff, J.A., 2008. Genetic diversity in natural populations: a fundamental component of plant–microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology.* 11:135-143.
- Samuels, G.J., 2006. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology* 96:195-206.

Références Bibliographies

- Sanchez-Hernandez, M.E., Ruiz-Davila, A., Perez De Algaba, A., Blanco Lopez, M.A., Trapero Casas, A., 1998. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:347-357.
- Sanglard, D., 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol.* 5:379-385.
- Scarselletti, R., Faull, J.L. 1994. *In vitro* activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Birkbeck coll., dep. biology, London Mycological research 98:1207-1209.
- Scott, J.C., Gordon, T.R., Kirkpatrick, S.C., Koike, S.T., Matheron, M.E., Ochoa, O.E., Truco, M.J., Michelmore, R.W., 2012. Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. *California Agriculture* 66:20-24.
- Sforza, R., Sheppard, A., 2004. La lutte biologique : introduction, espèces envahissantes, une méthode de lutte respectueuse de l'environnement. *Le courrier de l'Environnement de l'INRA*, n°19.
- Shanmugam, V., Sharma, V., Ananthapadmanaban, 2008. Genetic relatedness of *Trichoderma* isolates antagonistic against *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* inflicting carnation wilt. *Folia Microbiol (Praha)* 53:130-138.
- Shoresh, M., Harman, G.E., Mastoury, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Ann. Rev. Phytopathol* 48:21-43.
- Sivan, A., and Chet, I., 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.*, 135:675-682.
- Sofa, A., Scopa, A., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G., Troisi, J., Di Fiori, R., Novellino, E., 2011. *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* \times *P-canescens*). *Plant Growth Regul* 65:421-425.
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., Liu, X., 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Prot*, 23:243-247.
- Soubeyrand, S., Laine, A-L., Hanski, I., Penttinen, A., 2009. Spatio-temporal structure of interactions in a host-pathogen metapopulation. *American Naturalist* 174:308-320.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., et al., 2003. NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell.* 15:760-770.
- Sriram, S., Savitha, M.J., Rohini, H.S., Jalali, S.K., 2013. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oligonucleotide barcode and morphological characters. *Current Science* 104:1332-1340.

- T -

- Thangavelu, R., Palaniswami, A., Velazhahan, R., 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103:259-263.
- Thines, E., Weber, R.W.S., Talbot, N.J., 2000. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 12:1703-1718.
- Thordal-Christensen, H., 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 351-357.
- Thrall, P. H., Burdon, J. J., Young, A. G., 2001. Variation in resistance and virulence among demes of a single host-pathogen metapopulation. *J. Ecol.* 89:736-748.
- Tombesi, A., Tombesi, S., Andria, R., Lavini, A., Saavedra, M., Jardak, T., Fernández-Escobar, R., 2007. *Techniques de production en oléiculture* © Conseil oléicole international. Madrid, 346p.
- Ton, J., Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B., Turlings, T.C.J., 2007. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J.* 49:16-26.
- Trigui, A, Msallem, M. et al., 2002. Oliviers de Tunisie, In: *Catalogue des variétés autochtones et types locaux, identification variétale et caractérisation morpho-pomologique des ressources génétiques oléicoles de Tunisie* vol. 1. Ministère de l'Agriculture, IRESA, Institut de l'Olivier, Tunisia, 159 p.
- Triki, M.A., Priou, S., 1997. L'utilisation des traitements chimiques et biologiques pour réduire le risque de fuite de la pomme de terre causée par *Pythium aphanidermatum* en Tunisie. *Potato Res*, 40391-398.
- Triki, M.A., Hassairi, A., Majdoub, M., 2006. Première observation de *V. dahliae* en Tunisie Bulletin OEEO/EPPO n°36, 69-71.

Références Bibliographies

- Triki, M.A., Krid S., Hsairi H., loos, R., Gdoura, R. Rhouma, A., 2010. Occurrence of defoliating *Verticillium dahliae* pathotype on olive in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*.
- Triki, M.A., Rhouma, A., Krid, S., Khabou, W., Boulila, M. and loos, R. 2009. Recrudescence du dépérissement de l'olivier causé par les champignons telluriques en Tunisie. *Proceeding of Olivebioteq*. 15 - 19 décembre 2009, Sfax – Tunisie.
- Tseng, S.H., Liu, S.Y., Yang, H.H., Lo, C.T., Peng, K.C., 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *J Agric Food Chem* 56:6914-6922.

- V -

- Vallance, J., Le Floch, G., Deniel, F., Barbier, G., Levesque, C.A., Rey, P., 2009. Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 75: 4790-4800.
- Van Hulst, M., Pelser, M., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., and Ton, J., 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 5602-5607.
- Van Wees, S.C.M., De Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., et al., 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate- dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:8711-8716.
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe Interact* 17: 895-908.
- Verma, R.K., Prabh, N.D., Sankararamkrishnan, R., 2014. New subfamilies of major intrinsic proteins in fungi suggest novel transport properties in fungal channels: implications for the host-fungal interactions. *BMC Evolutionary Biology* 14: 173.
- Vesonder, R.F., Ciegler, A., Jensen, A.H., 1973. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl. Microbiol.* 26, 1008–1010.
- Villa, P., 2003. La culture de l'olivier. Editions De Vecchi S.A. Paris. 143 p.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., 2007. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1-10.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., and Lorito, M., 2014. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal* 8:127-139.
- Vincent, C., Panneton, B, Fleurat-Lessard, F., 2000. La lutte physique en phytoprotection. Edition INRA, Paris 2000, 396 pages.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L., Chet, I., 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* 305:42-48.
- Vos, C.M.F., de Cremer, K., Cammue, B.P.A., de Coninck, B., 2015. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Mol Plant Pathol.* 16:400-412.
- Vossen, P.D., Blanco M.A., 2008. *Verticillium* Wilt of olive. First press, newsletter of olive oil production and evaluation 3:1-9.

- W -

- Walid, L.D., Skirdej, A., Elattir, H., 2003. Transfert de technologie en agriculture. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA*.

- X -

- Xu, H, Cooke, J.E.K., Zwiazek, J.J., 2013. Phylogenetic analysis of fungal aquaporins provide insight into their possible role in water transport of mycorrhizal associations. *Botany* 91: 495–504.

Références Bibliographies

Xu, H., Kemppainen, M., El Kayal, W., Lee, S.H., Pardo, A.G., Cooke, J.E.K., Zwiazek, J.J., 2015. Overexpression of *Laccaria bicolor* aquaporin JQ585595 alters root water transport properties in ectomycorrhizal white spruce (*Picea glauca*) seedlings. *New Phytol* 205: 757-770

- Y -

- Yamada S., Bohnert H.J., 2000. Expression of the PIP aquaporin promoter-MipA from the common ice plant in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 41:719-725.
- Yang, F., Jensen, J.D., Svensson, B., Jorgensen, H.J.L., Collinge, D.B. Finnie, C., 2010. Analysis of early events in the interaction between *Fusarium graminearum* and the susceptible barley (*Hordeum vulgare*) cultivar Scarlett. *Proteomics* 10:3748-3755.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65:1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I., 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem* 38:863-873.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effects of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235:235-242.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. (2003) Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7343-7735.

1.a. Evaluation des niveaux de protection de *T. harzianum*

- Inoculation des jeunes plants d'olivier par les champignons dans différentes situations

- Diagnostiquer le niveau de protection de *Trichoderma* (*in planta*)

Mesure de croissance mycélienne

1.b. Suivi des niveaux d'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'immunité fondamentale de plants d'Olivier et potentiellement induits par *T. harzianum*

- Expression de plusieurs gènes intégrant différentes voies de défenses végétales : le stress oxydant, la voie des phénylpropanoïdes, des protéines PR, et des enzymes et facteurs de transcriptions impliqués dans les équilibres phytohormonaux de la plante (voie Salicylate/Jasmonate)

RTqPCR

1.c. Décryptage *in vitro* des mécanismes d'attaque que déploierait *T. harzianum* en contact avec *F. solani*

- Compréhension des Mécanismes cellulaires déployés par *Trichoderma* envers son champignon hôte *Fusarium* (test *in vitro*)

Microscopie optique

2.a. Caractérisation *in silico* des MIPs chez *Trichoderma*

Recherche de séquences MIP (NCBI, JGI) par Blast et mot clé «aquaporin»
Alignements et Phylogénie (phylogenie.fr)

2.a. Caractérisation *in silico* des MIPs chez *Trichoderma*

Recherche de séquences MIP (NCBI, JGI) par Blast et mot clé «aquaporin»
Alignements et Phylogénie (phylogenie.fr)

2.b. Evaluation des expressions MIPs chez *Trichoderma* lors d'interaction *in vitro* et *in planta*

RTqPCR

2.a. Caractérisation *in silico* des MIPs chez *Trichoderma*

Recherche de séquences MIP (NCBI, JGI) par Blast et mot clé «aquaporin»
Alignements et Phylogénie (phylogenie.fr)

2.b. Evaluation des expressions MIPs chez *Trichoderma* lors d'interaction *in vitro* et *in planta*

RTqPCR

2.c. Elaboration de la structure tridimensionnelle des MIP chez *Trichoderma* et identification de points de régulation majeurs pouvant prédire certaines activités perméase vis-à-vis de certaines molécules (eau, glycérol, polyols)

Simulation moléculaire
Collaboration avec Dr AUGIN université d'Orléans

• Introduction

• Objectifs

• Méthodologies

• Résultats

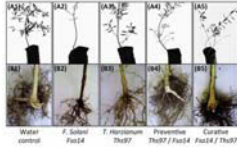
• Discussions

• Conclusion

• Perspectives

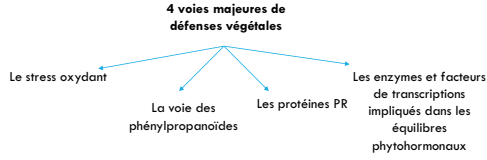


Question*1 *T. harzianum* a-t-il un impact sur la virulence de *F. solani* chez l'Olivier ?

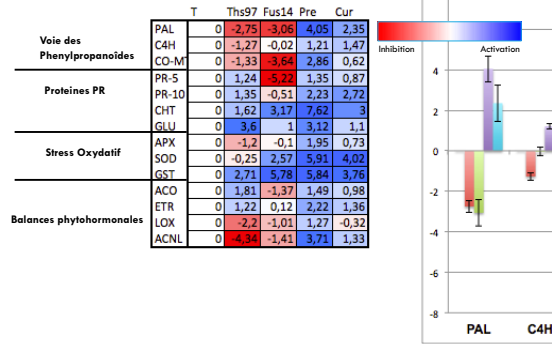


Stimulation de défenses végétales (feuilles)

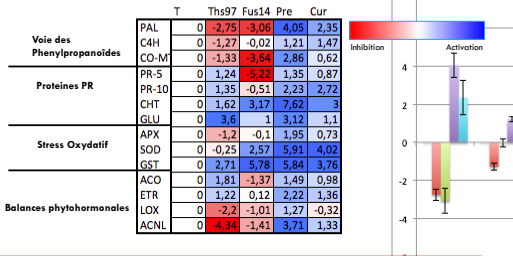
Induit la résistance systémique induite (ISR)



La modulation de gènes codant des protéines enzymatiques impliquées dans quatre voies majeures de défense chez l'Olivier



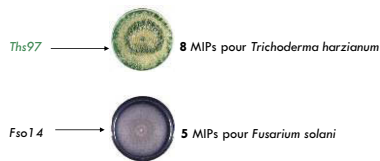
La modulation de gènes codant des protéines enzymatiques impliquées dans quatre voies majeures de défense chez l'Olivier



- *Ths97* stimule systématiquement l'activité des gènes de défense.
- *Fso14* tend à les inhiber.
- Activations générales, fortes et significatives des expressions en situation de co-inoculation

Question*2 Les perméases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de *T. harzianum* ?

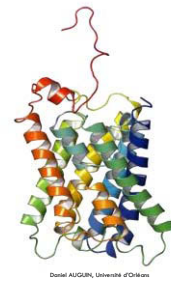
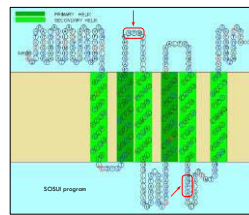
Les MIPs chez et *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)



Prédiction structurelle protéique des MIP de *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)

XIP *Trichoderma harzianum*

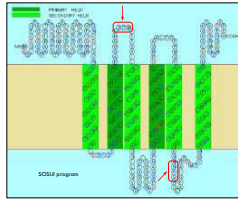
MESLQKTHPAGDGSPPAARISTASDGRPATSKMDLAAFQGSFAPGVRFQAVRLTP
WYRRRDYFVGQWVVDISVWKSAYVEFVATSLCLVLSGQITALESYQTPQVGGYI
GNSNLIATHYATAPASGPHBZZMTPFSAITGLCSVPRRLTYMCAQITLGGALAGGL
LGVYVGRKATSLQGGCCWYDPSQANPQGIYENRYSFSLLELRFQVGLDPRQ
AALEFPRMPLLVGASLGLVSFSGIPIFYAGAQVNEISRCFLAFGIARRDMTYQV
VWVFGPAVGLMGMGFYLPHPHVELSKQKESRMSMAGNTEVPEV*



Donné ALGURL, Université d'Orléans

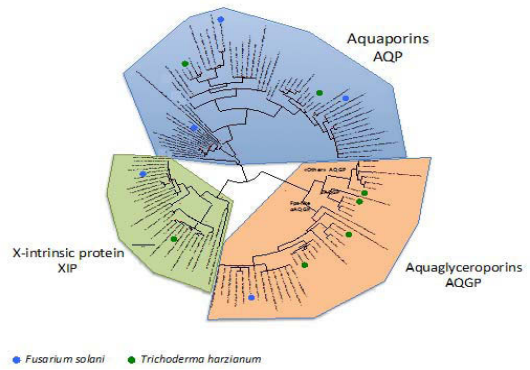
Prédiction structurelle protéique des MIP de *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)

XIP *Trichoderma harzianum*
 MESLQKTHPAGDGGSPFAARISTASDQRPAITSKMDLAAFDGSAFQVYRPGAVELTP
 WYERSDYFPGQVVDISVYKSAVYFVATSCVLSGQITALEYQITQVGGYI
 GSNILIAFYIATAPASGGHNPMTFSAITGLCSVPRGLYVCAQDTLGGALAGLIL
 LGVWVGRKATSLQGGGCVYDPSQANPQIYLVNFASFVLLFLSFGVGLDPRQ
 AALFGPRMGPLLVGASLGLVSPATSGIIPG YAGAGMQLZPCLAPGAPRDWITYQW
 VVWVFGVAVGCLMAGFVYVLPFRVYVLSKQKRESVNSMAKGTETVSY*

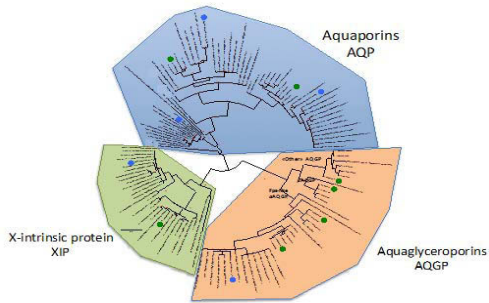


Les 8 séquences de *Trichoderma* et les 5 de *Fusarium* sont des MIPs

Diversité des MIPs chez *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)



Diversité des MIPs chez *Trichoderma harzianum* (et *Fusarium solani*)



Trichoderma et *Fusarium* présentent des MIPs qui se répartissent entre AQP, AQQP et des XIP

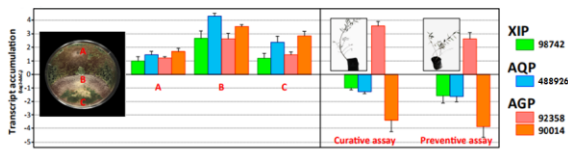
Profil d'expression MIP *in vitro* et chez l'Olivier

- Sur les 8 MIPs chez *Ths97*, 4 membres sont transcrits
 1 XIP
 1 AQP
 2 AGP

Profil d'expression MIP *in vitro* et chez l'Olivier

- Sur les 8 MIPs chez *Ths97*, 4 membres sont transcrits
 1 XIP
 1 AQP
 2 AGP

- Expression modulée en fonction des conditions biologiques dans lesquelles *Ths97* se développe



4 MIPs participeraient dans le réseau trophique

Etude des cis régulateurs des promoteurs *in silico*



	XIP 488926	AQP 98742	AQGP 92358	AQQP 90014
Carbon and nitrogen metabolic processes	77%	62%	81%	64%
Phosphate transport and metabolic processes				
Cellular cation homeostasis / xenobiotic transport	0,04%	0,04%	0,05%	0,04%
Cellular response to osmotic stress				
Cellular response to stress				
Cellular response to oxidative stress				

Très forte représentativité des motifs cis-régulateurs régulés par des sources carbonées, azotées et phosphorées

- Introduction
- Objectifs
- Méthodologies
- Résultats
- Discussions
- Conclusion
- Perspectives



1^{re} question : *Trichoderma* a un impact sur la virulence de *F. oleae* chez l'Olivier

résumé	

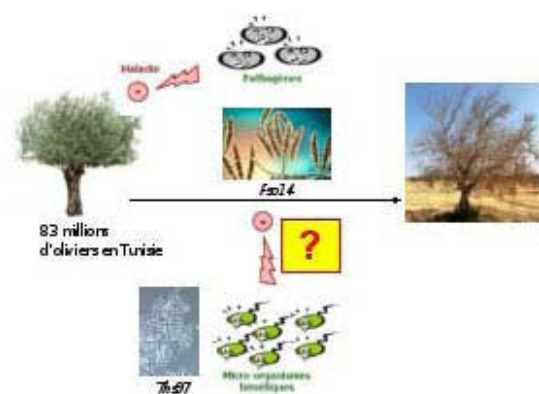
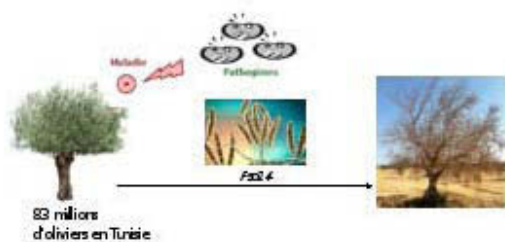
Trich est un sérieux candidat pour la lutte biologique contre la fusariose sur l'Olivier.

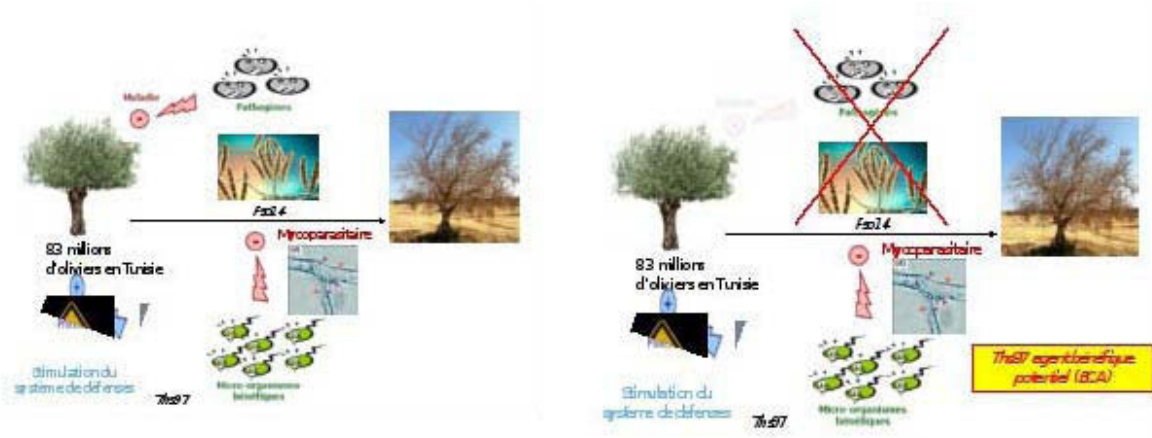
2^{me} question : Les perméases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de *T. laevigatum*?

structure	
à par la	

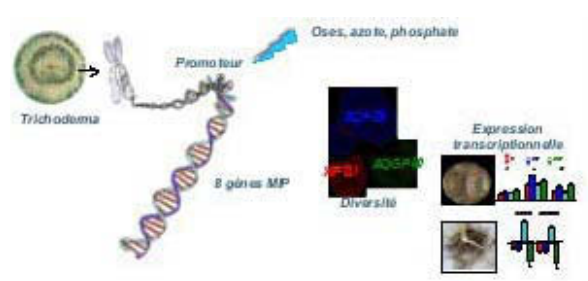
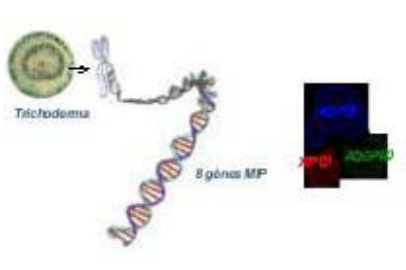
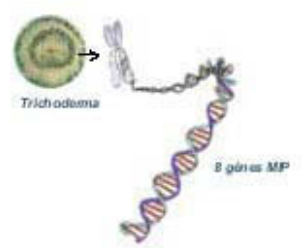
Les MIPs seraient de sérieux candidats à utiliser pour explorer les réseaux trophiques de *Trichoderma*, et pourraient être impliqués dans son pouvoir mycoparasitaire envers « ses hôtes ».

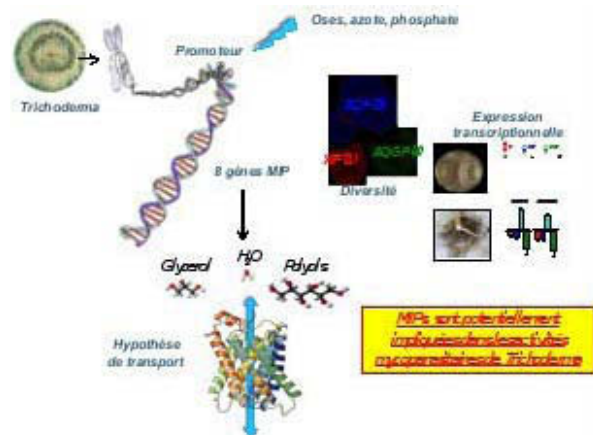
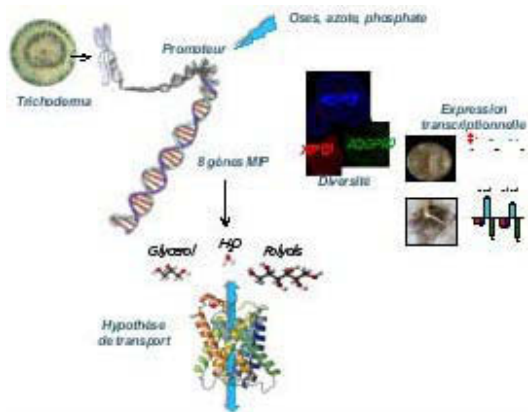
- Introduction
- Objectifs
- Méthodologies
- Résultats
- Discussions
- Conclusion
- Perspectives





2^{ème} question : Les protéases MIP seraient-elles impliquées dans les relations trophiques de *Trichoderma* ?

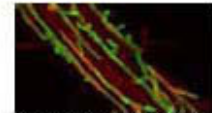




- Introduction
- Objectifs
- Méthodologies
- Résultats
- Discussions
- Conclusion
- Perspectives



Identifier chez *T. s97* les mycotoxines qui participeraient aux mécanismes antagonistes (antibiose)



Évaluer les mécanismes et lieux d'installation de *T. s97* au niveau racinaire chez l'Olivier
Identifier les éliciteurs déployés par *T. s97*, modulateurs des défenses végétales



Appréier la potentialisation de croissance de plants d'Olivier et leur potentiel de production par *T. s97*



Identifier les perméants et leur origine (hôtes ?) transportés par les MP es primés en situation de mycorrhizisme



MERCI POUR VOTRE ATTENTION