



HAL
open science

Contribution à l'analyse post-génomique de l'interaction entre le peuplier et *Melampsora larici-populina*, le champignon biotrophe responsable de la maladie de la rouille foliaire

Benjamin Petre

► To cite this version:

Benjamin Petre. Contribution à l'analyse post-génomique de l'interaction entre le peuplier et *Melampsora larici-populina*, le champignon biotrophe responsable de la maladie de la rouille foliaire. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0110 . tel-01751088

HAL Id: tel-01751088

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751088v1>

Submitted on 29 Mar 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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UFR Sciences et Technologies
E.D. Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Biologie Végétale et Forestière



IFR 110 Génomique, Ecophysiologie, Ecologie fonctionnelle
UMR 1136 INRA/Université de Lorraine
Interactions Arbres-Microorganismes

Thèse
présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
en biologie végétale et forestière
par **Benjamin PETRE**

**Contribution à l'analyse post-génomique de
l'interaction entre le peuplier et *Melampsora larici-
populina*, le champignon biotrophe responsable de la
maladie de la rouille foliaire**

Soutenance publique le 12 novembre 2012

Membres du jury :

Président :

Pr. Jean-Pierre Jacquot Professeur, Université de Lorraine, Nancy, France

Rapporteurs :

Pr. Sophien Kamoun Directeur, The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK
Dr. Thierry Rouxel Directeur de Recherche, INRA, Versailles, France

Examineurs :

Dr. Olivier Lamotte Chargé de Recherche, CNRS, Dijon, France
Pr. Nicolas Rouhier Professeur, Université de Lorraine, Nancy, France
Dr. Sébastien Duplessis Chargé de Recherche, INRA, Nancy, France

UMR 1136 INRA/Université de Lorraine Interactions Arbres/Microorganismes
Centre INRA de Champenoux – 54280 Champenoux
Faculté des Sciences et Technologies – 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Résumé : *Melampsora larici-populina* est un champignon biotrophe qui infecte le peuplier et cause la maladie de la rouille foliaire, entraînant d'importants dégâts dans les peupleraies. Un des objectifs de l'UMR Interactions Arbres/Microorganismes est de caractériser les déterminants moléculaires de ce pathosystème. Au cours de cette thèse, des approches post-génomiques ont permis de mener à bien quatre projets de recherche. Premièrement, l'analyse du transcriptome des temps précoces de l'interaction peuplier/*M. larici-populina* a révélé un transporteur de sulfate de peuplier fortement induit par l'infection (chapitre II). Deuxièmement, l'analyse phylogénomique de la famille des thaumatin-like proteins (TLP) a entre autres mis en évidence certains clades spécifiquement associés aux réponses aux stress chez le peuplier (chapitre III). Troisièmement, le gène codant la petite protéine sécrétée Risp de fonction inconnue est fortement induit lors des réponses de défense du peuplier et n'a pas d'homologue chez les autres plantes. La protéine recombinante est intrinsèquement désordonnée et présente une double activité de protéine antifongique envers *M. larici-populina* et d'éliciteur endogène des réponses de défense chez le peuplier (chapitre IV et V). La combinaison de ces deux propriétés n'a jamais été rapportée chez une protéine de plante. Enfin, les gènes *MlpP4.1* et *MlpH1.1* de *M. larici-populina* codent des petites protéines sécrétées riches en cystéines et de fonction inconnue, considérées comme des effecteurs candidats (chapitre VI). L'expression de *MlpP4.1* et *MlpH1.1* est très fortement induite lors de l'infection des feuilles de peupliers et des activités de virulence ont été observées chez *Arabidopsis thaliana*. Les analyses biochimique et structurale des protéines recombinantes sont en cours et ont déjà permis de démontrer la forte stabilité de MlpP4.1, probablement liée à la présence de plusieurs ponts disulfures. A l'aide des protéines recombinantes, plusieurs partenaires protéiques ont été identifiés chez les plantes permettant d'établir des hypothèses quant à leur rôle.

Mots clefs : arbre, basidiomycète, peptide de défense, protéine PR, effecteur

Abstract : *Melampsora larici-populina* is a biotrophic fungus that infects poplar and causes the foliar rust disease, leading to severe damages in plantations. A major aim of the Tree-Microbe Interactions department is to characterize molecular determinants of the pathosystem. During this thesis, four research projects were achieved through post-genomic approaches. First, transcriptome analysis of the early interaction between poplar and *M. larici-populina* revealed a fungal-induced host sulfate transporter (chapter II). Secondly, the phylogenomic analysis of the thaumatin-like protein (TLP) family uncovered some clades specifically associated with stress responses in poplar (chapter III). Thirdly, the gene encoding the small secreted protein of unknown function Risp is strongly induced during poplar defense responses and has no homolog in other plants. The recombinant protein is intrinsically disordered and presents a dual activity as an antifungal protein against *M. larici-populina* and as an endogenous elicitor of defense responses in poplar (chapter IV and V). The combination of both properties in a single protein has never been reported in plants. Finally, *M. larici-populina* *MlpP4.1* and *MlpH1.1* genes encode cysteine-rich small-secreted proteins of unknown function, considered as candidate effectors (chapter VI). *MlpP4.1* and *MlpH1.1* expression is strongly induced during poplar leaf colonization, and virulence activities were observed in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical and structural analyses of recombinant proteins are ongoing and already revealed the strong stability of MlpP4.1, likely due to the presence of several disulfide bridges. Several plant partners of the recombinant proteins were identified and have allowed for setting hypotheses about their role.

Keywords : tree, basidiomycete, host defense peptide, PR protein, effector

Remerciements

Avant toute chose, je voudrais remercier :

les membres de mon jury de thèse, **Sophien Kamoun, Thierry Rouxel, Olivier Lamotte, et Jean-Pierre Jacquot** pour avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux, l'**INRA** pour m'avoir fait confiance avec ce Contrat Jeune Scientifique, **Pascale, Eric, Nicolas et Francis** pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans l'UMR et dans les équipes 'redox' et 'écogénomique', pour leur accessibilité et leur écoute, **Armand Séguin**, pour m'avoir accueilli par deux fois dans son laboratoire à Québec, **Hugo Germain**, pour les séjours exceptionnels passés à Québec, pour tes conseils et ton amitié, les membres du laboratoire d'Armand à Québec pour votre accueil chaleureux, **Thomas Kroj**, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

J'adresse un remerciement particulier aux personnes suivantes:

Nico et Seb, beaucoup trop de choses à dire ici. Vous avez fait de ces trois années de thèse une expérience unique et inoubliable. Je mesure la chance que j'ai eu de tomber sur vous deux, ainsi que des conditions exceptionnelles de suivi, de formation et de conseils dont j'ai bénéficiés. L'aisance avec laquelle vous assaisonnez professionnalisme, passion et décontraction au travail crée un cocktail efficace et agréable dont je mesure la rareté et que j'espère retrouver dans ma vie professionnelle future. Je vous suis reconnaissant pour votre réactivité et votre application à améliorer chaque partie de ce manuscrit. J'espère avoir répondu à vos attentes. Dans un registre plus personnel, merci en vrac pour les nombreux BBQ et soirées arrosées, pour votre goût prononcé pour mes blagues de mauvais goût. Nico, merci pour les jorky, les fléchettes, les soirées (nuits) à jouer au tarot, les sorties VTT, les KFC. Seb, merci de m'avoir fait découvrir le capitaine et pour tous les mails intitulés 'genomics' quelquechose.

Stéph, tu as accompagné mes premiers pas au labo, j'ai entre autre découvert avec toi le mot 'effecteur', la RT-qPCR, comment faire de la biblio, annoter un gène, et tant d'autres choses. Nos discussions quotidiennes durant mon M2 ont fortement contribué à mon envie de continuer en thèse. Merci pour les collaborations fructueuses et j'espère que l'on aura l'occasion de retravailler ensemble dans le futur. Merci également pour les parties de ping-pong, les jorky, et les soirées BBQ-bières-cocktails avec les olives qui flottent. Un grand merci à toi, à Delphine et à tes parents pour les nombreuses randos dans les Vosges qui sont toujours des grands rendez-vous.

Arnaud, merci pour ton regard nouveau sur les méthodes et approches du labo. Tes corrections sur ce manuscrit ont également été très utiles.

Calypso, merci de m'avoir fait confiance pour superviser ton M1, pour ton efficacité et ta curiosité.

J'aimerais aussi remercier quelques collègues de bureau que j'ai pu côtoyer au jour le jour ces dernières années, aussi bien à l'INRA qu'à la faculté des sciences

Edgar, mon pote et compère de thèse avec qui on ne s'ennuie jamais. Merci pour toutes nos séances de badminton, de foot, ou autre sport, ainsi que les parties de frisbee, les batailles d'eau, le partage quasi-quotidien de vidéos douteuses ou de bandes annonces des chefs d'œuvre du 7^{ème} art. Les soirées jeux, tarot ou autre, les parties de fléchettes avec Nico ou

encore nos quelques sessions guitar hero autour d'une bière resteront de grands moments. Merci aussi pour avoir ré-équipé avec moi le labo en arbalètes et pistolets en tout genre, pour avoir assumé la co-paternité de Twiggy et surtout pour avoir été le maître d'ouvrage de notre magnifique accomplissement architectural qui trône fièrement à l'entrée du laboratoire.

Yann, mon collègue mi-fac/mi-INRA. Je ne sais pas si je dois te remercier pour m'avoir fait découvrir ton univers musical... En tout cas merci d'avoir conservé les dinosaures sur ton ordi et pour ton humour trash.

Vincent, je pensais te raconter une blague sur un PMU mais tu les connais déjà toutes... Continue à faire résonner ton rire communicatif dans les bureaux et prend bien soin d'Irina !

Ben, merci pour les innombrables parties de frisbee, basket-bureau, badminton et jorky ponctuées de discussion sur la physio et la bioch des plantes.

Cendrella et **Nico**, merci pour votre bonne humeur quotidienne et votre humour bien rodé sur les gens du nord et leurs travers.

Anne, merci d'avoir apporté une touche féminine au bureau de la fac. Prends bien soin de la voiture de ma sœur.

François, merci de m'avoir fait découvrir la finesse 'circulaire' du rap vendéen, et d'avoir si bien intégré le parler Lorrain. A bientôt Gros. !

Marlis, merci pour nos pauses capuccino et tes coups de pouce an anglais lors du M2. Ta soirée de fin de thèse restera un excellent souvenir, malgré les vidéos compromettantes qui en sont sorties.

Pete, thanks for your valuable advices in english and for the evenings at the bar, sharing opinions about royalty in UK.

J'aimerais également exprimer la gratitude aux autres membres du groupe redox à la fac. Donc merci à :

PA, le p'tit dernier, sosie de John Lennon. Tu es aussi discret que gentil. Merci d'être autant disponible et agréable au jour le jour, tout en cachant un humour décapant. Avec Edgar, on te confie la charge de la pyramide de canettes. Prends en soin !

Henry, pianiste virtuose mais cuisinier perfectible. Tu détiens à ma connaissance le record de la plus longue migration d'un gel d'acrylamide. Si tu survis à ta traversée de la France en vélo, je te souhaite sincèrement de continuer à exercer ta passion pour la recherche en thèse.

Jean-Pierre, tes cours de DEUG font partie des rares qui m'ont donné envie de continuer mes études à la fac et pour cela je tiens vraiment à te remercier. En outre, merci pour ta simplicité et ton humour (évite par contre la blague de la guêpe qu'il faut noyer, elle ne passe pas très bien en amphitheâtre...)

Kamel, pour ton envie intarissable pour discuter des projets de recherche et pour ton profond sens collectif.

Jé, pour tes coups de main, que ce soit durant cette thèse ou avant, lors de mes premiers pas en labo.

Bruno, pour avoir laissé une trace indélébile de ton passage au labo sur la voiture de PA, pour ton goût pour la mirabelle (en lien avec cette fameuse trace) et ton infatigable tchatte.

Lionel, tu as été indirectement à l'origine de l'arrivée de la cible de fléchette dans la salle café et on te doit beaucoup pour ça !

Mélanie, pour tes petites blagues distillées à l'occasion et pour les nombreux BBQ à Laneuveville.

Tiphaine, pour ta bonne humeur inébranlable et tes efforts à décorer la salle café avec des poissons.

Karl-Josef, it was a pleasure to meet you and your communicative laugh.

Antoine, pour ton humour discret mais certain.

Au sein du groupe d'écogénomique des interactions à l'INRA, merci à :

Francis, pour le livre sur les effecteurs qui m'a énormément servi durant la rédaction de ce manuscrit.

Claire, pour les manips avec *Magnaporthe* et avec les effecteurs de champignons.

Manue, pour les fichiers 'popsamère' et pour massacrer les certains thésards avec une seule main. T'assures ! A bientôt sur wow ?

Alice, je suis fan de ton langage châtié et de ton combat de chaque jour pour la créativité orthographique. Quand tu manges une mirabelle, ça fait vibrer le labo! T'es définitivement une fille de la Lorraine.

Marc, pour ton calme, ta bonne humeur et ton humour décalé.

Emilie, pour les manips de bioinfo, ta gentillesse et ton miel.

Annegret, pour les analyses des microarrays et les conseils sur la préparation des échantillons pour le séquençage.

Stéph \$, pour les petits coups de main avec les logiciels d'analyse d'image et les conseils pour mon orientation lors du M2.

Christine, pour toutes les RT-qPCR et les discussions sur les chats.

Patrice, pour ton aide lors des cultures de peuplier.

Annick, pour m'avoir permis de faire mes premiers pas dans le labo et pour m'avoir écrit une super lettre de recommandation pour le concours CJS.

Béa, ta franchise, ton excentricité et tes chansons ont agréablement rythmé mes journées lorsque nous étions voisins dans l'ancien bâtiment.

Angela et Adeline, vous avez apporté un peu du sud au laboratoire. Merci d'avoir gardé un œil sur Lucifer pour moi.

Valérie, pour ton humour et ta bonne humeur, ainsi que pour ton aide lors des TP de biologie végétale.

Panos et Josh, many thanks for your motivation to hang out around a beer and discuss about all strange things that french people do.

Nicole et Agnès, pour votre patience et votre efficacité pour la gestion à distance de mes ordres de mission que j'étais à la dernière minute.

Au sein des autres groupes du labo, merci à :

Pascal et Bénédicte, pour avoir toujours été prêts à fournir du matériel biologique et à discuter du peuplier et des rouilles. Merci également à vous de m'avoir embauché en job d'été et permis de découvrir l'univers de l'interaction peuplier/*Melampsora* bien avant que cela ne devienne mon sujet de thèse.

Jaime, pour les quelques soirées arrosées, les foots et jorjy, pour ton impressionnante maîtrise du français et pour m'avoir fait découvrir le Pisco et surtout Dawkins ! A bientôt au Chili ou ailleurs ?

Laurence, merci à toi et Rémi pour les moments amicaux passés ensemble depuis le M1.

Jean-Pierre, merci pour ton soutien technique et ta réactivité.

Parmi d'autres collègues et amis de l'INRA et de la fac, merci à :

JB, pour ces 2 années mémorables rue des Fabriques, qui ont été une transition parfaite entre la vie étudiante débridée d'avant thèse et la vie plus tranquille d'aujourd'hui. Merci en vrac pour avoir partagé abondamment tes goûts musicaux, tes histoires de chasse, ta cuisine 'à la normande', quelques gueuletons entre amis et tes meilleurs histoires sur la Moselle et ses habitants (c'est valable pour les Vosges aussi). Encore merci d'avoir partagé l'appart avec Lucifer, Cocaine, Kiki, Amageddon et Attila.

PJ, garchon du nord, merci pour ton calme, ton amitié et nos discussions sur tout et n'importe quoi lors des sessions ski, dégustations bières ou autres. J'espère que toi et Aure-Amélie allez passer du bon temps à New-York.

Nico, pour toutes ces années depuis les bancs de la fac en DEUG, les bonnes soirées de fin d'exams et les discussions sur la recherche 'qui vous gagne'. Peut-être à bientôt au Québec.

Renaud, je crois que si tu n'avais pas été là, je n'aurais pas pu passer le DEUG et ne pas finir ma thèse aujourd'hui. Un grand merci pour ces premières années de fac.

Jean, pour ton assiduité aux pots du labo à raconter comment tu envoies tes collègues en conseil de discipline, et pour tes vanes douteuses (et le mot est faible) dont tu as le secret.

M.-le-concierge-de-la-fac (et je ne doute pas que Nico et Mélanie se joindront à moi pour ce remerciement), pour avoir envoyé ma voiture à la casse deux mois avant la fin de cette thèse, alors qu'elle était gentille ment garée sur le parking du labo.

Patrice (et la je remonte un peu plus loin dans le temps), pour m'avoir fait glisser un pied dans un labo avant l'heure et pour tes histoires imagées sur l'importance des directeurs de thèse.

Afin d'être sûr de n'oublier personne, je voudrais tout simplement remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir ces dernières années dans la cadre de ma thèse.

Pour finir, un énorme merci à **mes parents** qui, par leur soutien financier et moral permanent, m'ont permis de faire des études dans d'excellentes conditions, ce qui me permet aujourd'hui d'avoir un job passionnant. Merci pour l'intérêt porté à mes recherches, pour votre soutien logistique sans faille (comme par exemple m'apporter mon poster à l'aéroport en vitesse quand je l'oublie en partant en congrès) et pour tous les week-ends reposants à la campagne.

Merci également à **ma sœur** pour avoir partagé la fibre de la biologie (même si les poissons, ça pue!).

Enfin, **Aurore**, merci pour tout ce que tu représentes, tes petites aides sur R, pour m'avoir rappelé si fréquemment le règlement du laboratoire et pour le bon millier de fautes d'orthographe que tu as corrigé dans ce manuscrit. Merci enfin pour ton enthousiasme communicatif, même si j'ai pu émettre quelques réserves lorsque ce dernier s'exprime avec verve sur les listes de diffusion de l'UMR lors de mes retours de mission.

LISTE DES ABBREVIATIONS

3D	tridimensionnel
aa	acide aminé
ABA	acide abscissique
ACC	acide-1-aminocyclopropane carboxylique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine di-phosphate
AMP	antimicrobial peptide
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine tri-phosphate
ATR	<i>Arabidopsis thaliana</i> recognized
Avr	avirulence
BAS	biotrophy-associated secreted
BIC	biotrophic interfacial complex
CAMP	cationic antimicrobial peptide
CAZyme	carbohydrate active enzymes
CC	coiled-coil
CDPK	calcium-dependent protein kinase
CFL	Centre de Foresterie des Laurentides
CHXC	cystéine-histidine-aa quelconque-cystéine
Cmu	chorismate mutase
CNL	CC-NB-LRR
CO ₂	dioxyde de carbone
CRN	crinkler
DAMP	damage-associated molecular pattern
Ecp	extracellular protein
EFPA	Ecologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques
EMBO	European Molecular Biology Organization
ETI	effector-triggered immunity
ETS	effector-triggered susceptibility
FAGE	Forêt Agronomie Génie de l'Environnement
FLS2	flagellin sensing 2
GFP	green fluorescent protein
HDP	host-defense peptide
Hop	hypersensitive reaction and pathogenicity (hrp)-outer protein
HypSys	hydroxyproline-rich systemin
HR	hypersensitive response
IAM	Interactions Arbres-Microorganismes
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
LRR	leucine-rich repeat
LTP	lipid transfer protein
LysM	lysine motif
LXLFLAK	leucine-aa quelconque-leucine-phénylalanine-leucine-alanine-lysine
MAMP	microbe-associated molecular pattern
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mb	mega base
MiSSP	mycorrhiza-induced small-secreted protein
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NB-LRR	nucleotide binding-leucine rich repeat

NO	nitric oxide
NPR1	non-expressor of PR 1
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
Pen	penetration
Pep	plant elicitor peptide
PRR	pattern-recognition receptor
PR	pathogenesis-related
PTI	PAMP-triggered immunity
R	resistance
REG	redundant effector group
RFP	red fluorescent protein
RGD	arginine-glycine-acide aspartique
RIP	repeat-induced point
Risp	rust-induced secreted protein
RLK	receptor-like kinase
RLP	receptor-like protein
ROS	reactive oxygen species
RP2E	Ressources, Procédés, Produits et Environnement
RTP1	rust-transferred protein 1
RXLR	arginine-aa quelconque-leucine-arginine
SA	salicylic acid
SAR	systemic acquired resistance
SSP	small-secreted protein
TAL	transcription-activator like
TIR	toll/interleukine 1-like receptor
TNL	TIR-NB-LRR
TLP	thaumatin-like protein
TLP-K	TLP-kinase
Tox	toxin
UMR	Unité Mixte de Recherche
UPRA	UPSC-INRA
UPSC	Umeå Plant Science Centre
Y/F/WxC	tyrosine/phénylalanine/tryptophane-aa quelconque-cystéine

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Les maladies causées par les champignons, oomycètes et bactéries phytopathogènes
Figure 2	Les types d'interactions possibles entre les microorganismes parasites et les plantes
Figure 3	Les événements majeurs en phytopathologie depuis le milieu du XIXème siècle
Figure 4	Modèle en zigzag des interactions moléculaires plantes-parasites
Figure 5	Modèles des interactions moléculaires plantes-parasites
Figure 6	Les éliciteurs peptidiques endogènes chez les plantes
Figure 7	Modèle d'amplification des réponses de défense par les éliciteurs peptidiques endogènes
Figure 8	Les couples PRR/ligands du système immunitaire végétal
Figure 9	Spécificité des MAMP, DAMP et systèmes de reconnaissance végétaux

Figure 10	Activation des PRR et réseau de signalisation du PTI
Figure 11	Modèles d'activation de l'expression des gènes de défense par NPR1
Figure 12	Méthodes de démonstration de l'activité antimicrobienne des protéines PR
Figure 13	Les peptides cationiques antimicrobiens CAMP et leur évolution
Figure 14	Interaction des peptides antimicrobiens avec leurs cibles
Figure 15	Les phytoalexines et leur sécrétion
Figure 16	Multifonctionnalité des HDP
Figure 17	La fermeture des stomates comme mécanisme de défense face aux bactéries
Figure 18	Réponse systémique acquise, mémoire transgénérationnelle et signaux associés
Figure 19	Les catégories d'effecteurs des microorganismes associés aux plantes
Figure 20	Fonctions ciblées par les effecteurs de <i>Pseudomonas syringae</i>
Figure 21	Les effecteurs TAL, régulation du transport de sucre et virulence des bactéries
Figure 22	Les effecteurs de <i>Phytophthora infestans</i> : motifs de translocation conservés et expression
Figure 23	Les génomes séquencés de champignons et d'oomycètes parasites des plantes
Figure 24	Les répertoires d'effecteurs candidats établis chez les champignons
Figure 25	Mode de fonctionnement de Cmu1 d' <i>Ustilago maydis</i>
Figure 26	Les structures de sécrétion des effecteurs des champignons biotrophes
Figure 27	Détection directe d'effecteurs transloqués depuis un champignon dans une cellule infectée
Figure 28	Les différents types de protéines de résistance aux champignons pathogènes chez les plantes
Figure 29	Modèles d'interactions R – Avr
Figure 30	Modèle d'activation des NB-LRR
Figure 31	La différence quantitative PTI/ETI
Figure 32	PTI et ETI empreintent des voies de signalisation similaires
Figure 33	Les signatures de pression de sélection positive chez les effecteurs RXLR
Figure 34	L'évolution de facteurs de virulence supprimant l'ETI chez les champignons
Figure 35	Evolution du mode de vie biotrophe chez les agents pathogènes filamenteux des plantes
Figure 36	Modèle d'évolution des microorganismes eucaryotes vers la biotrophie et la nécrotrophie
Figure 37	Diversité des répertoires d'effecteurs de type III chez <i>Pseudomonas syringae</i>
Figure 38	Zones riches en gènes encodant des effecteurs au sein des génomes de parasites eucaryotes
Figure 39	Résistance non-hôte et persistance macro-évolutive des parasites
Figure 40	Classification du genre <i>Populus</i>
Figure 41	La populiculture et la maladie de la rouille foliaire du peuplier
Figure 42	Modèle décrivant les réponses de défense du peuplier à <i>Melampsora larici-populina</i> et les principales étapes d'infection des tissus foliaires
Figure 43	Les Pucciniales sur leurs hôtes
Figure 44	Les maladies des rouilles dans les cultures

- Figure 45 Les approches génomiques sur le peuplier et son microbiome au sein de l'UMR IAM
- Figure 46 Les approches transcriptomiques sur le pathosystème peuplier/*Melampsora spp.*
- Figure 47 Objectifs et avancement des projets de recherche menés durant la thèse
- Figure 48 Un transporteur de sulfate de peuplier est induit par *M. larici-populina*
- Figure 49 Evolution et diversification des TLP en famille multigénique chez le peuplier
- Figure 50 Modèle illustrant le rôle de Risp dans l'immunité du peuplier
- Figure 51 Feuille de route pour la caractérisation et l'identification des effecteurs et de leurs cibles
- Figure 52 Schéma bilan des connaissances acquises sur le pathosystème peuplier/*M. larici-populina* au cours de cette thèse

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 PAMP et DAMP qui élicitent des réponses de défense chez les plantes
- Tableau 2 Les protéines PR
- Tableau 3 Effecteurs bactériens avec fonctions et cibles connues
- Tableau 4 Les effecteurs de champignons

LISTE DES ENCADRES

- Encadré 1 Les thaumatin-like proteins (TLP) dans les produits de consommation courante
- Encadré 2 Grand bal des effecteurs : qui inviter?
- Encadré 3 Apports des structures 3D pour la compréhension des effecteurs d'eucaryotes

LISTE DES ARTICLES

- Article n° 1 Hacquard *et al.*, Journal of Pathogens, 2011 (Chapitre I)
- Article n° 2 Petre *et al.*, PLoS ONE, 2012 (Chapitre II)
- Article n° 3 Petre *et al.*, BMC Plant Biology (Chapitre III)
- Article n° 4 Petre *et al.*, en préparation (Chapitre IV)
- Article n° 5 Petre *et al.*, en préparation (Chapitre V)
- Article n° 6 Hacquard *et al.*, MPMI, 2012 (Chapitre VI)
- Article n° 7 Petre *et al.*, en préparation (Chapitre VI)
- Article n° 8 Petre *et al.*, Acte du séminaire RP2E, 2011 (Annexes)
- Article n° 9 Dowkiw *et al.*, acte de congrès soumis (Annexes)

SOMMAIRE

PARTIE I : INTRODUCTION DE PHYTOPATHOLOGIE GENERALE	21
1. Les maladies des plantes	21
2. Modes de vie des parasites et types d'interaction avec les plantes	23
3. Historique et perspectives de la phytopathologie moléculaire	23
PARTIE 2 : LE ZIGZAG DES INTERACTIONS MOLECULAIRES PLANTES/PARASITES	27
1. Le modèle en zigzag : les éliciteurs, les effecteurs et leurs récepteurs	27
2. Le PTI : reconnaître, signaler et répondre	29
2.1. Reconnaissance des PAMP et DAMP par les PRR	29
2.1.1. PAMP et DAMP, déclencheurs du PTI	29
2.1.2. Les éliciteurs peptidiques endogènes, amplificateurs du PTI	32
2.1.3. Les PRR, sentinelles des frontières cellulaires	35
2.1.4. L'identification des couples PAMP/PRR	35
2.2. Voies de signalisation menant au PTI	37
2.2.1. Voies activées de manière quasi-immédiate	37
2.2.2. Voies activées de manière précoce	38
2.2.3. La régulation des gènes	40
2.3. Les réponses de défense	41
2.3.1. Les protéines antimicrobiennes	41
2.3.2. Les peptides antimicrobiens	43
2.3.3. Les métabolites antimicrobiens : les phytoalexines	45
2.3.4. Sécrétion focalisée des molécules de défense et dépôt de callose	47
2.3.5. La multifonctionnalité des molécules de défense	47
2.3.6. Réponses spatio-temporelles : au delà du cadre cellulaire	50
2.3.7. Réponses de défense et contexte environnemental	52
3. L'ETS : les effecteurs, facteurs de la compatibilité	53
3.1. Les effecteurs des biotrophes : définition et limites du concept	53
3.2.1. Les effecteurs de type III chez <i>Pseudomonas</i> et la suppression de l'immunité	55
3.2.2. Les effecteurs TAL chez <i>Xanthomonas</i> et la régulation des gènes de l'hôte	57
3.3. Les effecteurs des oomycètes	57
3.3.1. Les répertoires d'effecteurs candidats avec des motifs conservés	59
3.3.2. Les facteurs de virulence d'oomycètes	59
3.4. Les effecteurs des champignons	61
3.4.1. Les répertoires d'effecteurs candidats fongiques : les petites protéines sécrétées	61
3.4.2. L'expression dynamique des effecteurs candidats in planta	63
3.4.3. Les facteurs de virulence/compatibilité	64
3.5. Sécrétion, entrée et diffusion des effecteurs eucaryotes dans les cellules hôtes	68
3.5.1. Les systèmes de sécrétion directe	68
3.5.2. Structures de sécrétion des effecteurs fongiques	68
3.5.3. Les évidences de localisation intra-cellulaire	69
3.5.4. L'internalisation des effecteurs dans les cellules hôtes: le flou règne	69
3.5.5. Les champignons augmentent leur portée : la diffusion des effecteurs	72
4. L'ETI et la relation R - Avr	73
4.1. Les couples R - avr impliquant des effecteurs de champignon	73
4.2. Les modèles d'interaction R - Avr	75
4.2.1. L'interaction protéine-protéine	75
4.2.2. L'interaction promoteur-protéine	76
4.3. L'activation des protéines NB-LRR	78
4.4. Réponses de défense de l'ETI : le PTI en plus fort	78
5. Le zigzag à l'échelle de l'évolution	80
5.1. La suppression de l'ETI	82
5.1.1. La perte du facteur d'avirulence responsable de l'ETI	82
5.1.2. Le gain d'un facteur de virulence supprimant l'ETI	84
5.2. Restauration de l'ETI et évolution des gènes de résistance chez les plantes	85
5.3. Les répertoire d'effecteurs dans la co-évolution plantes-parasites biotrophes	86

5.3.1. Evolution des champignons et oomycètes parasites biotrophes	86
5.3.2 Mécanismes d'évolution des répertoires d'effecteurs candidats	88
5.4. Les effecteurs qui déterminent le spectre d'hôte	91
PARTIE III : L'INTERACTION PEUPLIER – MELAMPSORA LARICI-POPULINA	95
1. Le peuplier : un arbre d'intérêt agronomique et un arbre modèle	95
1.1. Le genre <i>Populus</i>	95
1.2. La populiculture et le cultivar Beaupré	95
1.3. Le peuplier : un arbre modèle	98
2. Les Pucciniales	99
2.1. Mode de vie et structures d'infection	99
2.2. Maladies des rouilles : symptômes et conséquences sur les cultures	101
2.3. Le genre <i>Melampsora</i> et <i>Melampsora lini</i>	104
3. L'interaction peuplier- <i>M. larici-populina</i>	105
Article n° 1 : The Poplar-Poplar Rust Interaction: Insights from Genomics and Transcriptomics	107
PARTIE IV : OBJECTIFS DE LA THESE	120
1. Contexte général des recherches sur la physiologie moléculaire des interactions biotrophes au sein de l'UMR IAM	120
2. Objectifs de la thèse	122
2.1. Analyse transcriptomique des temps précoces de l'interaction peuplier/ <i>Melampsora larici-populina</i> par pyroséquençage 454 (Chapitre II)	124
2.2. Analyse <i>in silico</i> des thaumatin-like proteins du peuplier (Chapitre III)	124
2.3. Analyse de Risp, une protéine de défense multifonction du peuplier (Chapitre IV et V)	124
2.4. Analyse des effecteurs candidats de <i>M. larici-populina</i> (Chapitre VI)	126
CHAPITRE II : ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES TEMPS PRECOSES DE L'INTERACTION PEUPLIER/MELAMPSORA LARICI-POPULINA PAR PYROSEQUENÇAGE 454	129
Article n° 2 : RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen <i>Melampsora larici-populina</i> uncovers PtSultr3;5, a fungal-induced host sulfate transporter	131
CHAPITRE III : ANALYSE GENOMIQUE DES THAUMATIN-LIKE PROTEINS CHEZ LE PEUPLIER	145
Article n° 3 : Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar	147
CHAPITRE IV : ANALYSE GENOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE DE RECEPTOR-LIKE PROTEINS (RLP) CHEZ LE PEUPLIER ET IDENTIFICATION DE LA PROTEINE RISP COMME NOUVEL ELICITEUR DU SYSTEME IMMUNITAIRE CHEZ LE PEUPLIER	165
Article n°4 : Genome-wide analysis of <i>RLPs</i> and physically-associated genes in poplar unravels a novel endogenous peptide elicitor	167
CHAPITRE V : ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE RISP DE PEUPLIER	191
Article n°5 : A poplar cationic small-secreted protein elicits plant defense responses and directly inhibits pathogen growth.	193
CHAPITRE VI : ANALYSE DES EFFECTEURS CANDIDATS DE MELAMPSORA LARICI-POPULINA	227
Article n° 6 : A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identifies Candidate Effectors in <i>Melampsora larici-populina</i> (Poplar Leaf Rust)	229
Article n° 7 : Poplar leaf rust candidate effectors: virulence activities, structural characterization and plant targets	247

CHAPITRE VII : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES 279

1. Questions et stratégie de recherche liées à l'étude du pathosystème peuplier/ <i>M. larici-populina</i> au sein de l'UMR IAM	281
1.1. Bases moléculaires de l'interaction R - Avr	281
1.2. L'identification de nouveaux composants du système immunitaire végétal	282
1.3. L'identification de facteurs de virulence du champignon	283
2. La description du transcriptome à des temps précoces d'interaction pour cribler des fonctions clefs chez le peuplier et <i>M. larici-populina</i>	283
2.1. Le RNA-Seq, une nouvelle approche pour analyser les interactions plante-parasite biotrophe	284
2.2. PtSultr3;5, du sulfate pour les biotrophes associés au peuplier ?	284
2.3. Des effecteurs candidats exprimés précocement <i>in planta</i>	286
3. Les TLP, agents de la défense pré-invasive	287
3.1. Les TLP des fruits : des édulcorants antimicrobiens	287
3.2. Les TLP-K : une évolution de la défense vers la reconnaissance des parasites ?	289
4. Risp: un peptide de défense multifonctionnel du peuplier	289
4.1. Risp, une nouvelle protéine antifongique	290
4.2. Risp, un nouvel éliciteur endogène des réponses de défense des plantes	290
4.3. Risp, un peptide de défense multifonctionnel chez les plantes	292
5. Identification et analyse des effecteurs de <i>M. larici-populina</i> : développement d'outils pour réaliser l'analyse fonctionnelle <i>in vivo</i>	292
5.1. <i>M. larici-populina</i> , un modèle émergent pour l'étude de la biologie des rouilles fongiques et de la biotrophie	293
5.2. Un répertoire de plusieurs centaines d'effecteurs candidats	293
5.3 Les apports de l'analyse des protéines recombinantes MlpP4.1 et MlpH1.1	294
5.3.1. Le domaine N-terminal de MlpP4.1 : un adaptateur flexible pour interagir avec des partenaires ?	294
5.3.2. L'utilisation des protéines recombinantes pour identifier des partenaires protéiques <i>in vitro</i>	295
6. Conclusion	297
7. Perspectives à court terme	299
7.1 Valider l'induction des réponses de défense par Risp chez le peuplier	299
7.2 Démontrer de manière plus précise la sécrétion de Risp	300
7.3 Structures et partenaires des effecteurs candidats	300
8. Perspectives à long terme	301

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 305

ANNEXES 335

Article n° 8 : Les apports de la génomique pour l'étude des familles multigéniques : exemple des thaumatin-like proteins (TLPs) chez le peuplier. **337**

Article n° 9 : Breeding poplars with durable resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust: a multidisciplinary approach to understand and delay pathogen adaptation. **349**

CHAPITRE I : Analyse bibliographique, contexte et objectifs de la thèse

CHAPITRE I

Analyse bibliographique, contexte et objectifs de la thèse

Analyse bibliographique, contexte et objectifs de la thèse

Les plantes constituent la première et principale source de nourriture pour les humains qui les cultivent et pour les microorganismes qu'elles hébergent. Malgré l'existence d'un système immunitaire végétal complexe, certains parasites adaptés à leurs hôtes parviennent à les infecter et entraînent en général une maladie associée à la colonisation des tissus. Ces agents pathogènes, quand ils infectent des plantes cultivées ou des populations naturelles, entraînent des pertes importantes qui peuvent menacer l'approvisionnement de populations humaines en nourriture ou perturber de manière brutale des écosystèmes. Pour mieux faire face à ces maladies, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances des processus immunitaires et parasitaires qui définissent les interactions plantes-parasites, aux échelles moléculaires et évolutives. Un cadre conceptuel appelé le modèle en 'zigzag' a été proposé en 2006 pour définir les interactions moléculaires plantes-parasites intervenant non seulement chronologiquement au cours d'une infection mais aussi au cours de l'évolution. En fonction de ces interactions, ce modèle prédit de manière quantitative la résistance des plantes et de manière qualitative l'issue de l'interaction comme compatible ou incompatible. La maladie de la rouille foliaire causée par *Melampsora larici-populina* entraîne d'importants dégâts dans les peupleraies. Ce pathosystème est un modèle émergent pour réaliser l'étude du système immunitaire des arbres et des mécanismes moléculaires de la virulence des parasites biotrophes.

Ce chapitre est composé de quatre parties écrites en français, la troisième incluant un article de synthèse en anglais publié en 2011 dans la revue *Journal of Pathogens*. Dans la partie I, j'introduis brièvement la phytopathologie et son histoire, je définis les principaux modes de vie des parasites et les types d'interaction avec leurs hôtes. Dans la partie II, je fais un bilan des connaissances actuelles sur les interactions moléculaires entre plantes et microbes, en utilisant le modèle en zigzag comme trame de mon exposé. Ce modèle est essentiellement centré sur le tryptique éliciteurs-effecteurs-récepteurs replacés dans le contexte d'une interaction simplifiée à l'échelle cellulaire. Du côté de l'hôte, j'élargis mon analyse aux molécules de défense, aux voies de signalisation et aux réponses systémiques. Du côté des microbes, j'insiste essentiellement sur les fonctions de virulence des effecteurs. A la fin de cette partie, je replace mon exposé dans un contexte évolutif plus large en abordant brièvement la relation non-hôte et ses déterminants moléculaires. Cette analyse porte essentiellement sur les bactéries, oomycètes et surtout champignons biotrophes. Les interactions moléculaires avec d'autres parasites (plantes parasites, virus, nématodes, insectes) biotrophes ou nécrotrophes ne sont pas abordées, de même que le rôle des petits ARN dans les réponses de défense. Dans la partie III, je présente brièvement le peuplier en tant qu'arbre modèle et les maladies des rouilles en général. Le pathosystème peuplier-*M. larici-populina* est introduit dans un article de synthèse publié dans la revue *Journal of Pathogens*, dans lequel je replace avec mes co-auteurs les avancées réalisées en génomique et en transcriptomique sur cette interaction. Dans la partie IV, j'expose brièvement le contexte des recherches au sein de l'Unité Mixte de Recherche Interactions Arbres-Microorganismes (UMR IAM) et la manière dont mes objectifs de thèse se sont intégrés dans le projet du laboratoire.

PARTIE I : INTRODUCTION DE PHYTOPATHOLOGIE GENERALE

1. Les maladies des plantes

On désigne la maladie comme une altération anormale et significative des fonctions d'un organisme. La phytopathologie désigne la science qui étudie les maladies des plantes, qui sont causées notamment par trois grands groupes de microorganismes : les champignons, les oomycètes et les bactéries (Dodds et Rathjen 2010). Collectivement, ces 3 groupes de microorganismes peuvent infecter la quasi-totalité des plantes et de leurs organes (Figure 1). Par exemple, les champignons causent des maladies telles que le charbon du maïs (*Ustilago maydis*), la rouille brune du blé (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), la pyriculariose du riz (*Magnaporthe oryzae*) ou la pourriture grise des fruits (*Botrytis cinerea*). De même, les oomycètes sont responsables de nombreuses maladies des Solanacées comme le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*) ou encore de la mort subite des aulnes (*Phytophthora alni*) et des chênes (*Phytophthora ramorum*). Les bactéries causent par exemple les maladies des taches foliaires (*Pseudomonas syringae*) ou les feux bactériens (*Erwinia amylovora*). Certains symptômes des maladies peuvent profondément modifier le phénotype des plantes infectées comme les galles causées par *Agrobacterium tumefaciens* ou les pseudo-fleurs engendrées par *Puccinia monoica*. Lorsque les parasites colonisent des cultures, ils entrent en compétition avec l'homme pour ces ressources et peuvent fortement influencer les sociétés humaines. Par exemple, les épidémies de l'oomycète *P. infestans* sont responsables de la grande famine européenne dans les années 1840. Plus récemment, les épidémies de *Phakopsora pachyrhizi*, l'agent de la rouille asiatique du soja en Amérique du sud ou encore l'émergence de races hypervirulentes de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, agent de la rouille noire du blé, ravivent les menaces sur les principales productions agricoles à l'échelle mondiale. Certains parasites peuvent également perturber de manière brutale l'équilibre d'un écosystème, comme par exemple *P. ramorum* qui cause la mort subite du chêne et décime les forêts dans l'ouest des Etats-Unis. L'évolution et la dispersion rapide de ces parasites rendent leur contrôle extrêmement difficile, et mettent en relief nos capacités d'adaptation limitées. Pour mieux faire face aux infections et à l'évolution rapide des agents pathogènes, il est nécessaire d'approfondir les connaissances des processus moléculaires liés au parasitisme des microbes et à l'immunité des plantes.

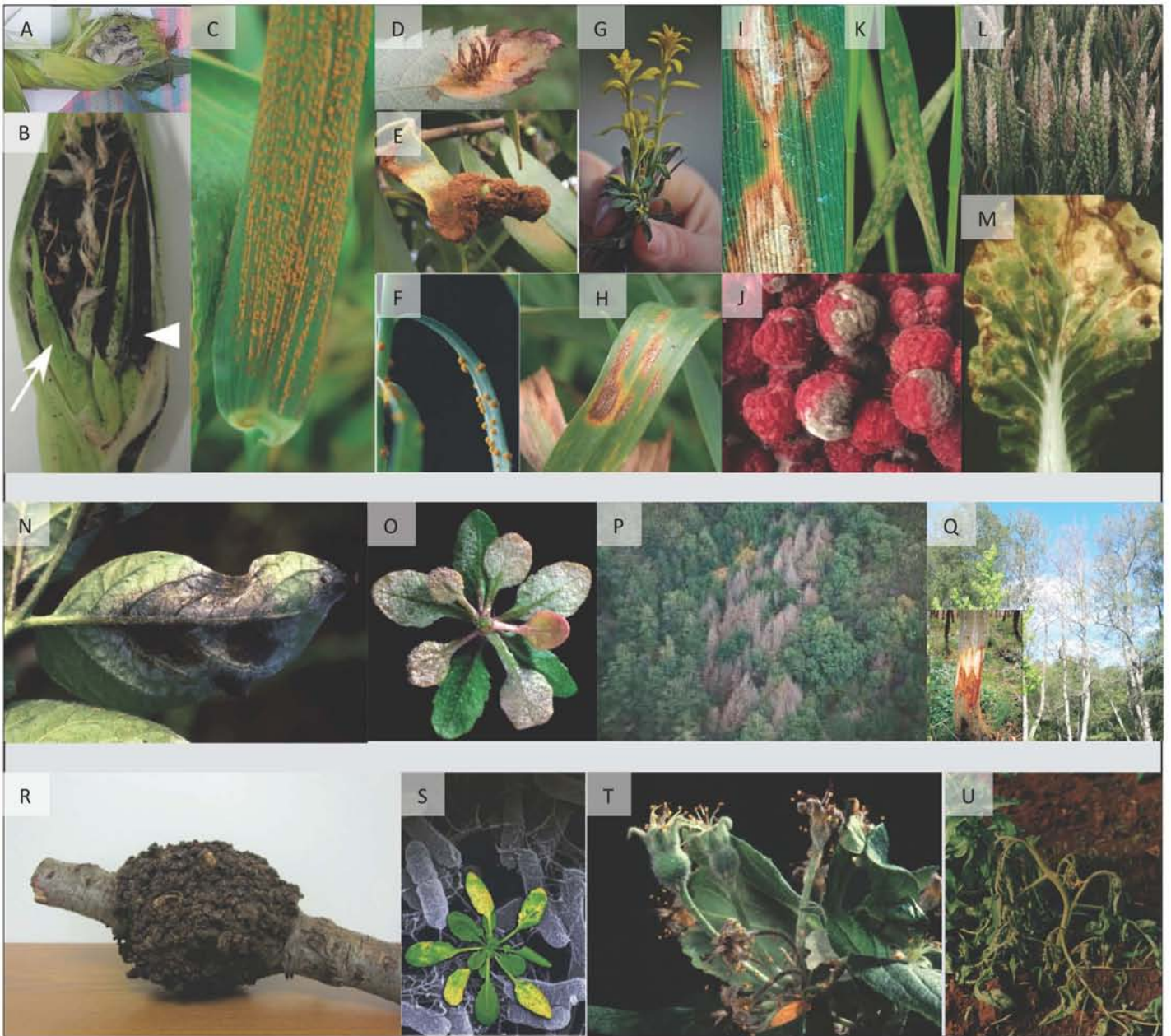


Figure 1. Les maladies causées par les champignons, oomycètes et bactéries phytopathogènes

(A-G) Maladies causées par des champignons basidiomycètes. (A) Maladie du charbon causée par *Ustilago maydis* sur un épi de maïs. (B) Formation de spores (triangle blanc) et de structures mimant des feuilles (flèche blanche) dans un épi de maïs infecté par *Sporisorium reilianum*. (C) Pustules de la rouille brune du blé formées par *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. (D) *Gymnosporangium cornutum* sur le sorbier des oiseleurs. (E) *Atelocauda digita* sur les feuilles de koa. (F) Urédies traduisant l'infection du lin par l'agent de la rouille du lin *Melampsora lini*. (G) Pseudo-fleurs induites par *Puccinia monoica* chez l'*Arabis*. (H-M) Maladies causées par des champignons ascomycètes. (H) Blé infecté par *Mycosphaerella graminicola*. (I) Maladie de la pyriculariose du riz causée par *Magnaporthe oryzae*. (J) Pourritures grises causées par *Botrytis cinerea* sur des framboises. (K) Orge infecté par *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. (L) Blé infecté par *Fusarium graminearum*. (M) Symptôme sur une feuille infectée par *Colletotrichum higginsianum*. (N-Q) Maladies causées par des oomycètes. (N) *Phytophthora infestans* sur une feuille de pomme de terre. (O) *Hyaloperonospora arabidopsidis* sur *Arabidopsis thaliana*. (P) Vue aérienne d'une zone boisée avec des arbres morts suite à une infection par *Phytophthora ramorum*. (Q) Dépérissement des aulnes dû à *Phytophthora alni*. L'insert présente un chancre sur une tronc d'aulne. (R-U) Maladies causées par des bactéries. (R) Galle engendrée sur une branche de cerisier par *Agrobacterium tumefaciens*. (S) Symptômes foliaires chez *Arabidopsis thaliana* dus à une infection par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Les bactéries sont visibles en fond par microscopie électronique à balayage (T) Fleurs de pommiers infectées par *Erwinia amylovora*. (U) Plant de tomate infecté par *Ralstonia solanacearum*.

Adapté de Dean et al., MPP, 2012 / Mansfield et al., MPP, 2012 / Schirawski et al., Science, 2010 / Grant et Jones, Science, 2009 / Ellis et al., Annual Reviews in Phytopathology, 2007 / Boller et He, Science, 2009 / Coates et Beynon, Annual Reviews in Phytopathology, 2010 / www.apsnet.org

2. Modes de vie des parasites et types d'interaction avec les plantes

Les microorganismes parasites sont généralement regroupés dans trois grandes catégories selon leur stratégie d'infection. Les nécrotrophes tuent les tissus de leur hôte afin de s'en nourrir, tandis que les biotrophes établissent une interaction durable avec les tissus vivants au sein desquels ils se développent (Dodds et Rathjen 2010). Les hémibiotrophes adoptent un statut intermédiaire, avec une phase biotrophe dans les premiers temps d'infection, suivie d'une phase nécrotrophe. On distingue également différentes catégories d'interactions plantes-parasites (Figure 2). L'interaction dite « non-hôte » est la plus répandue dans la nature. Elle désigne l'incompatibilité fondamentale entre une espèce de plante et une espèce de parasite (la plante n'est pas un hôte pour le parasite qui ne peut l'infecter). Par opposition, la relation dite « hôte » existe entre deux espèces lorsque certains biotypes de chaque espèce peuvent interagir pour former des interactions compatibles ou incompatibles. La relation incompatible réfère à une résistance totale (ou résistance qualitative) d'un biotype (ou cultivar) particulier de plante à un biotype (ou souche, pathovar) du parasite alors qualifié d'avirulent. Au contraire, la relation compatible aboutit à une colonisation de la plante (dite sensible) par le parasite alors qualifié de virulent. Lors de la relation compatible, la colonisation du parasite peut varier de manière quantitative, pouvant être maximale (sensibilité totale de la plante) ou plus réduite (résistance partielle de la plante).

Le spectre des microbes associés aux plantes s'étend au-delà des agents pathogènes, puisque de nombreuses espèces mutualistes établissent des associations réciproquement profitables avec les plantes. Ces symbiontes biotrophes présentent la capacité à coloniser un hôte végétal et à le modifier pour une interaction plus ou moins durable durant laquelle ils vont dériver des nutriments à partir de structures spécialisées formées chez leur hôte (Selosse 2008). A ce titre, ils seront mentionnés dans ce manuscrit uniquement lorsque leur étude aura permis des avancées majeures concernant l'étude des effecteurs potentiellement impliqués dans les mécanismes de compatibilité avec l'hôte.

3. Historique et perspectives de la phytopathologie moléculaire

On estime à environ 10 000 ans l'âge des premiers pas de l'homme en agriculture. Dès l'antiquité, des preuves existent de la prise de conscience de la présence de maladies associées à ces cultures et de la volonté de les limiter (Herman 2012). Dans la seconde moitié du XIX^{ème} siècle, Pasteur et Koch énoncent la théorie des germes qui stipule que

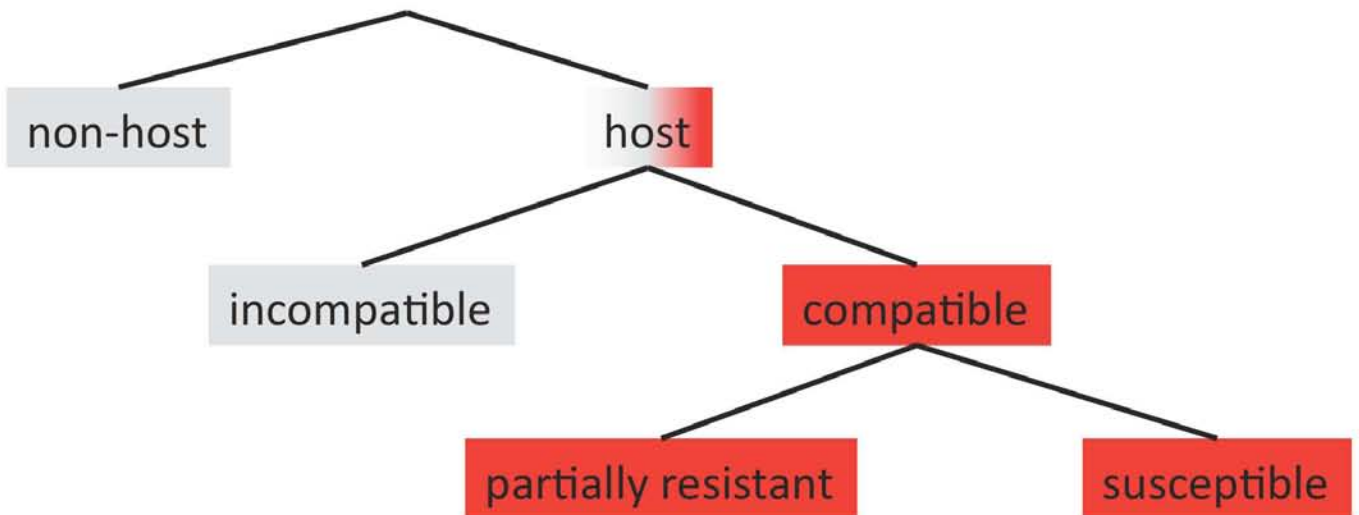


Figure 2. Les types d'interactions possibles entre les microorganismes parasites et les plantes

Le gris désigne l'absence de colonisation ou une colonisation limitée des tissus de l'hôte par le parasite, tandis que le rouge désigne un succès de colonisation des tissus de l'hôte.

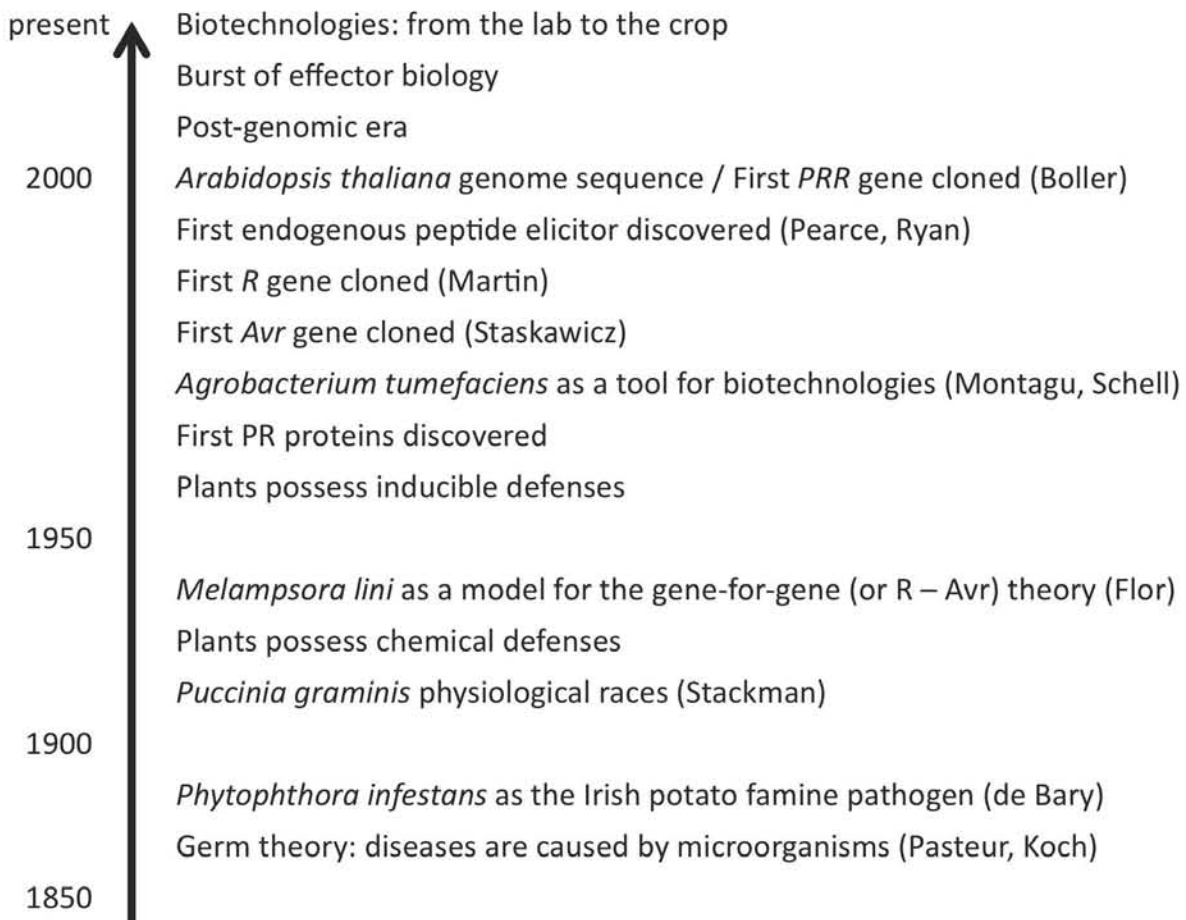


Figure 3. Les événements majeurs en phytopathologie depuis le milieu du XIXème siècle

Adapté de Staskawicz, 'Effectors in plant-microbe interactions', 2012 / Herman, cours de phytopathologie 'The Plant Cell', 2012

Chapitre I

les maladies sont causées par des microorganismes (Figure 3). A cette même période, la première bactérie phytopathogène (*E. amylovora*) est découverte, tandis que *P. infestans* est identifié comme étant l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre. Au début du XX^{ème} siècle, l'observation que certains biotypes d'agents pathogènes entraînent une maladie seulement sur certains cultivars de plantes a été un moteur fort des premières recherches en phytopathologie. Notamment, Stackman a proposé le concept de 'race physiologique' après avoir constaté que des races de *P. graminis* issues d'un cycle sexuel pouvaient donner des souches de virulence variables sur les variétés de blé (Stackman 1914). Dans les années 1940, Flor proposa une explication génétique sur le concept des races physiologiques. En utilisant le pathosystème lin-*Melampsora lini* (agent de la rouille du lin), il montra qu'un seul gène à la fois chez l'hôte et chez le champignon détermine la capacité d'une souche à infecter un cultivar donné (Flor 1942). Ses observations menèrent au concept de la relation dite gène-pour-gène ou relation résistance - avirulence (R - Avr ; résistance et avirulence étant des traits dominants) qui sert encore aujourd'hui de cadre conceptuel pour les programmes d'amélioration des plantes. C'est également dans cette première partie du XX^{ème} siècle qu'ont été découverts les premiers systèmes de défense des plantes, après qu'il ait été établi une corrélation entre la présence de certaines molécules chez les plantes et la résistance aux agents pathogènes. Le caractère inductible de ces défenses a été établi dans les années 1960 par l'observation de ce que l'on appelle actuellement la réponse systémique acquise (SAR ; systemic acquired resistance) chez des plants de tabac infectés par le virus de la mosaïque. C'est également à cette époque qu'ont été mis au point les premiers fongicides systémiques. Les premières protéines spécifiquement induites lors des réactions de défense, regroupées sous le terme de protéines PR (pathogenesis-related), ont été isolées biochimiquement au cours des années 1970 (Van Der Wel et Loeve, 1972 ; Van Loon et Van Strien, 1999). Au début des années 1980, la bactérie phytopathogène *A. tumefaciens* fut utilisée pour introduire de manière ciblée du matériel génétique dans les plantes, ouvrant la voie aux techniques modernes de transformation génétique (Caplan *et al.*, 1983). En 1984, plus de quarante ans après la conceptualisation de la relation R - avr, le premier gène d'avirulence a été cloné chez la bactérie pathogène du soja *P. syringae* pv. *glycinea* (Staskawicz *et al.*, 1984 ; Staskawicz 2012). Ce n'est qu'en 1990 qu'il a été montré que ces protéines d'avirulence ont également un rôle dans la virulence des parasites (Kearney et Staskawicz, 1990). C'est

Chapitre I

également au début de cette décennie que le premier gène de résistance a été cloné chez la tomate, ainsi que le premier gène d'avirulence de champignon chez *Cladosporium fulvum* (Martin *et al.*, 1993 ; Van Kan *et al.*, 1991 ; Nishimura et Dangl 2010 ; Stergiopoulos et de Wit 2009). La systémine, le premier peptide endogène capable d'éliciter des réponses de défense chez les plantes, a été identifiée en 1991 (Pearce *et al.*, 1991 ; Ryan et Pearce 2003). L'année 2000 verra l'identification du premier récepteur capable de reconnaître un éliciteur microbien (FLS2, récepteur de la flagelline), ainsi que la publication du génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Gomez-Gomez et Boller 2000 ; The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Le début du XXI^{ème} siècle marque l'entrée des interactions moléculaires plantes-parasites dans l'ère de la génomique, puis très vite, dans celle dite de post-génomique. Entre autres, l'étude des génomes a permis d'identifier et d'analyser l'évolution des éliciteurs, des effecteurs, des récepteurs et des protéines PR, molécules clefs étudiées en phytopathologie moléculaire (Haas *et al.*, 2009 ; McCann *et al.*, 2012 ; Fritz-Laylin *et al.*, 2005 ; Meyers *et al.*, 2003 ; Van Loon *et al.*, 2006). Associées aux analyses transcriptomiques, ces études permettent également de caractériser à l'échelle du génome les reprogrammations génétiques associées à la résistance des plantes ou à la virulence des parasites (Eulgem 2004 ; Both *et al.*, 2005). Enfin, au cours des cinq dernières années la biologie des effecteurs a émergé comme front de science très actif, qui contribue à établir une vision intégrée des interactions plantes-parasites à l'échelle moléculaire (Hogenhout *et al.*, 2009 ; Dodds et Rathjen 2010). Un premier modèle, dit modèle en zigzag, établira en 2006 le cadre conceptuel des recherches menées sur les interactions plantes-parasites (Jones et Dangl 2006). Les biotechnologies commencent seulement à intégrer les connaissances acquises sur les effecteurs pour développer de nouvelles ressources agro-alimentaires résistantes aux parasites (Lacombe *et al.*, 2010 ; Horvath *et al.*, 2012).

PARTIE 2 : LE ZIGZAG DES INTERACTIONS MOLECULAIRES PLANTES/PARASITES

1. Le modèle en zigzag : les éliciteurs, les effecteurs et leurs récepteurs

Contrairement aux animaux qui possèdent un système immunitaire composé de cellules spécialisées mobiles et capables de s'adapter aux agents pathogènes, le système immunitaire végétal est intégré au sein de chacune des cellules de la plante, qui possède ses propres détecteurs, voies de signalisation et mécanismes de défense (Spoel et Dong 2012). La vision actuelle du système immunitaire végétal comme un système à deux niveaux fut proposée en 2006 par Jones et Dangl dans le modèle dit en zigzag (Jones et Dangl 2006). Ce modèle en quatre phases décrit les interactions qui interviennent entre les molécules des parasites et de leurs plantes hôtes, et traite de leurs conséquences quantitatives sur les réponses de défense et qualitatives sur l'issue de l'interaction (Figure 4). Les trois premières phases suivent la chronologie d'une infection unique à une échelle spatiale localisée, tandis que la quatrième phase illustre les interactions moléculaires à l'échelle micro-évolutive. Au cours de la phase 1, des molécules conservées des microbes, désignées sous le terme de PAMP ou MAMP (pathogen/microbe-associated molecular patterns ; PAMP sera utilisé préférentiellement dans ce chapitre) sont présentes dans l'apoplaste et détectées par des récepteurs immunitaires, eux-mêmes nommés PRR (pattern recognition receptors) et situés au niveau de la membrane plasmique. Ces PRR vont éliciter un premier niveau d'immunité appelé PTI (PAMP-triggered immunity) marqué par des réponses de défense modérées qui sont suffisantes pour empêcher la colonisation de parasites non-adaptés. Lors de la phase 2, les parasites sécrètent des effecteurs qui peuvent interférer avec le PTI et manipuler la structure et les fonctions dans les tissus infectés de manière à favoriser l'infection. Cette phase au cours de laquelle les effecteurs fonctionnent comme des facteurs de virulence est appelée l'ETS (effector-triggered susceptibility), car c'est au cours de cette phase qu'est provoquée la sensibilité de la plante. Dans certains cas, au cours de la phase 3, des récepteurs immunitaires appelés 'protéines de résistance' (R) détectent la présence d'effecteurs et déclenchent un second niveau d'immunité nommé ETI (effector-triggered immunity) qui est marqué par de fortes réponses de défense. L'ETI mène généralement à une réponse hypersensible (HR) et à la résistance complète de la plante au parasite. Les effecteurs qui déclenchent l'ETI sont alors qualifiés de facteurs d'avirulence (Avr), puisqu'ils entraînent l'avirulence du parasite. Enfin, la phase 4 illustre l'évolution de parasites capables de rétablir l'ETS, en perdant le facteur

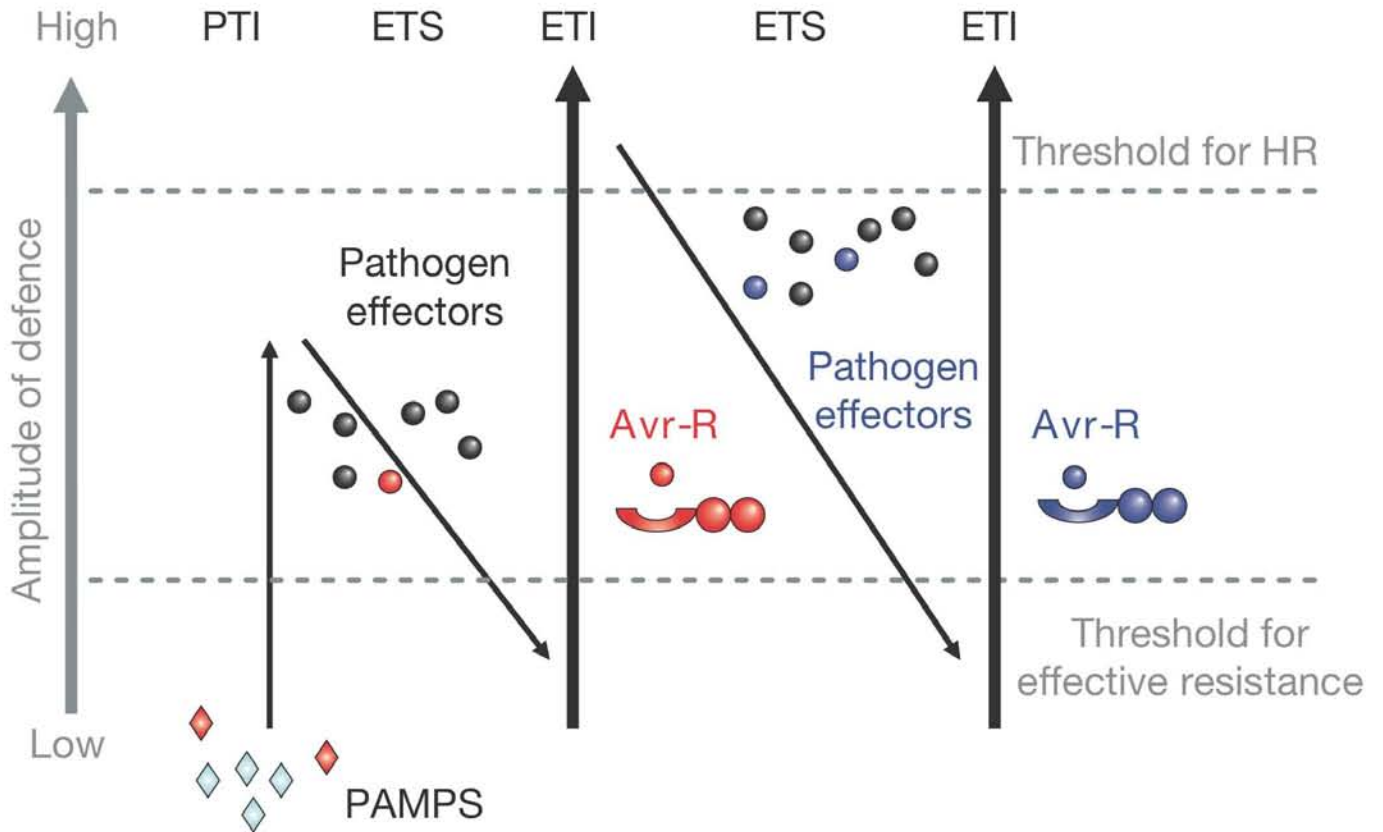


Figure 4. Modèle en zigzag des interactions moléculaires plantes-parasites

Phase 1: les PAMP (pathogen-associated molecular patterns) élicitent des réponses de défense modérées (PTI; PAMP-triggered immunity). Phase 2: de par leur fonction de virulence, les effecteurs répriment le PTI et entraînent la susceptibilité de l'hôte (ETS; effector-triggered susceptibility). Phase 3 : un effecteur (ou facteur d'avirulence Avr) est reconnu par un composant (dit facteur de résistance ou protéine de résistance R) du système immunitaire (relation dite R - Avr), ce qui déclenche d'importantes réponses de défense (ETI; effector-triggered immunity) qui culminent avec une réponse hypersensible (HR) et la résistance complète de la plante. Phase 4 : au cours de l'évolution, un phénomène appelé 'course aux armements' favorise l'apparition de souches ayant perdu un facteur d'avirulence chez le parasite, ce qui permet de restaurer l'ETS chez la plante. Ce même phénomène favorise l'émergence de plantes possédant des gènes de résistance capables de reconnaître un nouvel effecteur et de restaurer l'ETI.

Jones et Dangl, Nature, 2006

d'avirulence responsable de l'ETI ou en gagnant de nouveaux facteurs de virulence capables d'inhiber l'ETI. En réponse, évoluent des plantes possédant de nouvelles résistances pouvant rétablir l'ETI en reconnaissant de nouveaux effecteurs. Cette phase 4 suit un processus dit de 'course aux armements' qui résulte de l'intime co-évolution entre plantes et parasites.

Depuis la publication de ce modèle, plusieurs auteurs ont proposé des variantes en y apportant un concept nouveau ou des modifications. Par exemple, Dodds et Rathjen ont remplacé les processus en zigzag dans le contexte cellulaire sans intégrer de notion temporelle au modèle, que ce soit celui de l'infection ou celui de l'évolution (Dodds et Rathjen 2010 ; Figure 5A). D'autre part, Boller et Felix ont proposé un modèle basé sur l'idée que les plantes reconnaissent et signalent de manière générale un danger. Ils ont introduit le concept de DAMP (damage-associated molecular patterns) en phytopathologie et souligné l'idée que des molécules de plantes peuvent également être les éliciteurs de réponses de défense. Ils ont supprimé la distinction PTI/ETI pour préférer le terme général de syndromes de défense (Boller et Felix 2009 ; Figure 5B). Enfin, un grand nombre d'auteurs ont revisité ce modèle pour l'adapter à des situations plus ciblées sur un pathosystème donné, sur des phases particulières ou encore sur la manière dont ce modèle peut intégrer les compromis évolutifs liés aux réponses différentes vis-à-vis des biotrophes et des nécrotrophes (Thomma *et al.*, 2011 ; Katagiri et Tsuda 2010 ; Terauchi et Yoshida 2010 ; Kliebenstein et Rowe 2008).

2. Le PTI : reconnaître, signaler et répondre

On peut distinguer trois phases dans l'établissement d'une réponse de type PTI : la reconnaissance de molécules témoignant de la présence d'un parasite (c'est-à-dire les éliciteurs), la signalisation de cette reconnaissance et les réponses de défense pour stopper l'infection.

2.1. Reconnaissance des PAMP et DAMP par les PRR

Les éliciteurs généraux sont des molécules d'origine microbienne (PAMP) ou végétale (DAMP) qui indiquent la présence d'un parasite. Leur reconnaissance par les PRR du système immunitaire constitue la première étape dans l'établissement du PTI.

2.1.1. PAMP et DAMP, déclencheurs du PTI

Certaines molécules conservées sont retrouvées de manière abondante chez les microorganismes, et peuvent leur être spécifiques. Par exemple, la chitine est présente

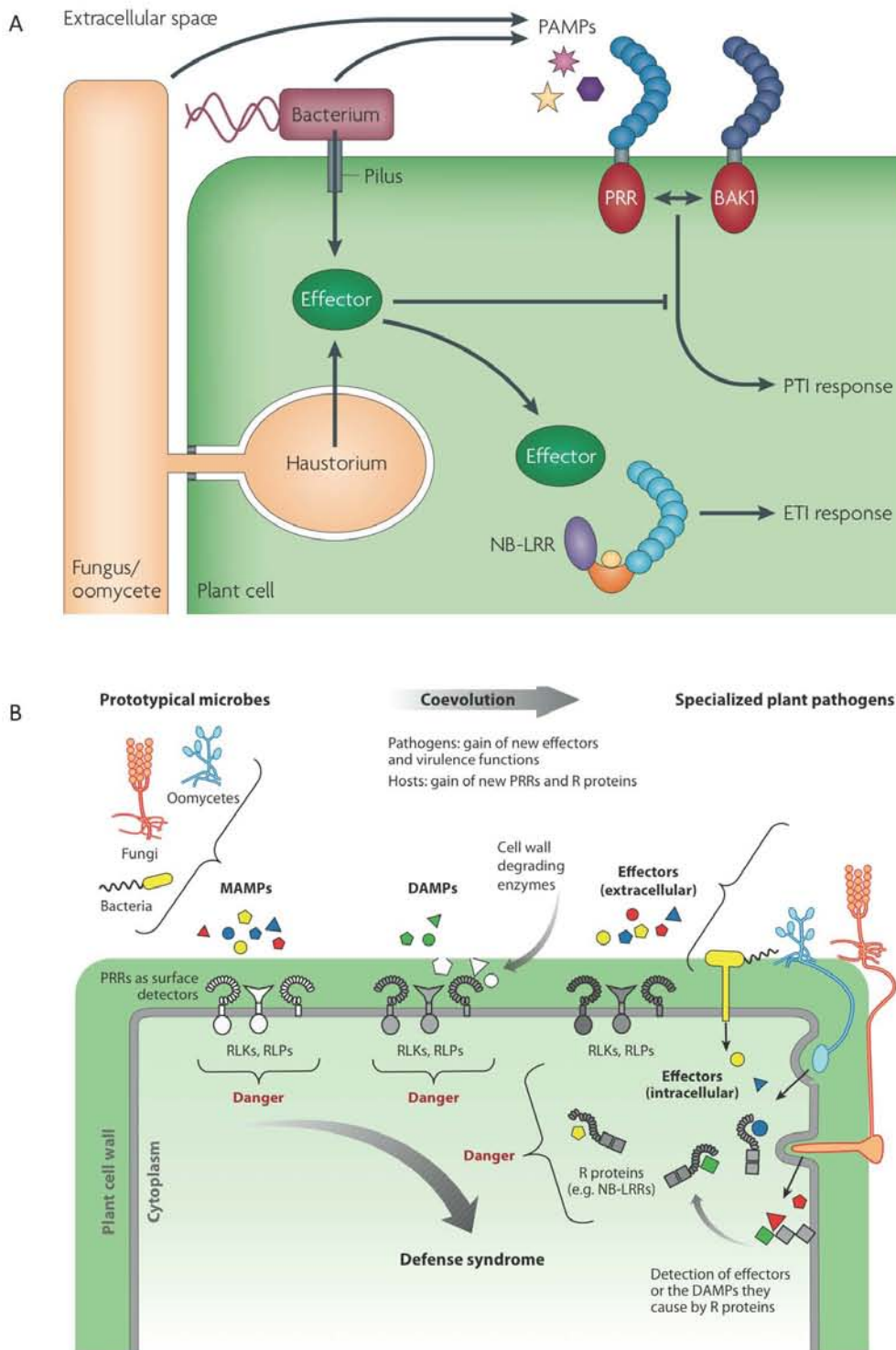


Figure 5. Modèles des interactions moléculaires plantes-parasites

(A) Les PAMP sont reconnus par les récepteurs membranaires (PRR; pattern-recognition receptors), qui s'hétéro-dimérisent avec BAK1 (brassinosteroids insensitive 1-associated kinase) pour déclencher le PTI. Les bactéries sécrètent des effecteurs dans la cellule hôte par leur pilus tandis que champignons et oomycètes biotrophes différencient des haustoria pour sécréter leurs effecteurs. Les effecteurs suppriment le PTI, mais certains sont reconnus par des récepteurs cytoplasmiques tels que les protéines NB-LRR (nucleotide binding leucine-rich repeat), qui déclenchent alors l'ETI. (B) En plus des PAMP, les PRR peuvent détecter des DAMP (damage-associate molecular patterns) qui sont des éliciteurs endogènes. Cette reconnaissance est signalée sous la forme d'un signal de danger qui aboutit à un syndrome de défense. La reconnaissance d'effecteurs de parasites ayant co-évolué avec l'hôte accentue le syndrome de défense.

Dodds et Rathjen, Nature Reviews in Genetics, 2010 / Boller et Felix, Annual Reviews in Plant Biology, 2009

Chapitre I

Tableau 1. PAMP et DAMP qui élicitent des réponses de défense chez les plantes

Elicitor origin	Nature	Elicitor (PAMP/MAMP/DAMP)	Receptor (species)	Receptor type		
Bacteria	protein	flagellin (flg22)	FLS2 (arabidopsis)	LRR RLK		
			NbFLS2 (tobacco)	LRR RLK		
			LeFLS2 (tomato)	LRR RLK		
			OsFLS2 (rice)	LRR RLK		
		peptidoglycan	peptidoglycan	elongation factor (EF-Tu; elf18)	EFR (arabidopsis)	LRR RLK
				ax21	Xa21 (rice)	LRR RLK
				cold shock protien (CSP)	-	-
				DNA processing protein DprA	-	-
				CitG MdcB	-	-
				ATP-dependent RNA helicase RhlB	-	-
				conserved hypothetical protein	-	-
				LYM1 (arabidopsis)	LysM RLP	
				LYM3 (arabidopsis)	LysM RLP	
CERK1 (arabidopsis)	LysM RLK					
Oomycete	protein	lipopolysaccharides	-	-		
			elicitin (INF1)	NbLRK1 (tobacco)	Lectin-like RLK	
Fungi	oligosaccharide glycopeptide	heptaglucoside glycopeptide	transglutaminase (pep13)	100 kDa protein glucanase		
			-	-		
			-	-		
Fungi	polysaccharide	chitin	CERK1 (arabidopsis, rice)	LysM RLK		
			CEBiP (rice)	LysM RLP		
	protein	xylanase	LeEIX1 (tomato)	LRR RLP		
			LeEIX2 (tomato)	LRR RLP		
Plant	oligosaccharide	oligogalacturonide	WAK1 (arabidopsis)	wall-associated kinase		
			-	160 kDa protein		
	protein	systemin	plant elicitor peptides (pep)	PEPR1 (arabidopsis)	LRR RLK	
			-	PEPR2 (arabidopsis)	LRR RLK	
			-	-		
		hypsins	inceptin	subpep	-	-
				GmPep914	-	-
				-	-	

Adapté de Chinchilla et Boller, Effectors in Plant-Microbe Interactions, 2012 / McCann et al., PNAS, 2012 / Yamaguchi et al., Plant Physiology, 2011 / Yamaguchi et Huffaker, Current Opinion in Plant Biology, 2011 / Monaghan et Zipfel, Current Opinion in Plant Biology, 2012 / Brunner et Nurnberger, PNAS, 2012.

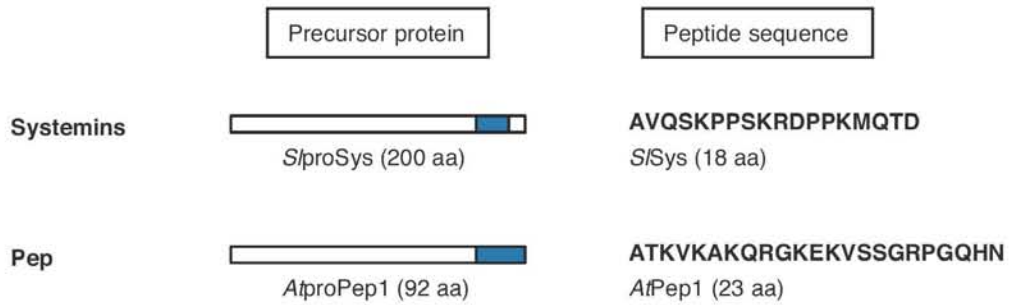
au sein des parois de tous les champignons et la flagelline est un composant essentiel des flagelles bactériens. Ces molécules ne sont pas présentes chez les plantes, et ces dernières ont la capacité de reconnaître ces molécules comme des indicateurs aspécifiques de la présence d'un microorganisme dans les tissus (Zipfel et Robatzek 2010). Ces molécules conservées reconnues par les plantes sont qualifiées d'éliciteurs ou encore PAMP lorsqu'elles déclenchent une réponse de défense de type PTI (Monaghan et Zipfel 2012). Des PAMP, essentiellement de nature protéique ou polysaccharidique, ont été identifiés chez l'ensemble des microorganismes associés aux plantes comme par exemple la flagelline ou les peptidoglycanes chez les bactéries, les transglutaminases et glucanes chez les oomycètes ou encore la chitine et des xylanases chez les champignons (Tableau 1). D'autre part, lors de leur progression au sein de leurs hôtes, les microorganismes endommagent ou modifient certains composants extracellulaires des tissus végétaux. Par exemple, de l'acide galacturonique est libéré des parois lorsque celles-ci sont soumises à l'action d'enzymes de dégradation, ce qui élicite également le PTI. Les plantes ont donc la capacité de percevoir la présence de microorganismes de manière aspécifique et indirecte, en suivant les perturbations engendrées par l'infection au sein des tissus.

2.1.2. Les éliciteurs peptidiques endogènes, amplificateurs du PTI

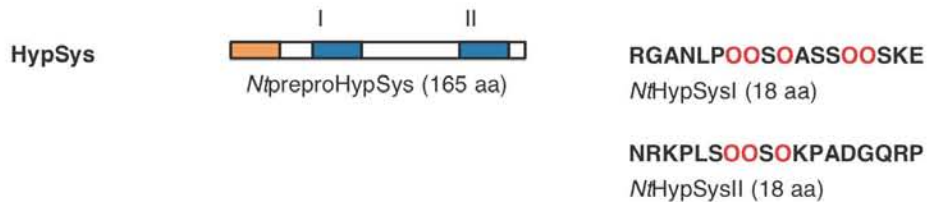
Certains petits peptides de plantes présents dans l'apoplaste peuvent également éliciter le PTI (Yamaguchi et Huffaker 2011 ; Ryan et Pearce 2003). Ces peptides sont issus de précurseurs protéiques qui peuvent être cytoplasmiques ou sécrétés dans l'apoplaste, et dont les fonctions, quand elles sont connues, ne sont pas en lien avec les mécanismes de défense (Figure 6). L'expression des gènes codants ces précurseurs est induite par l'attaque de parasites ou par des blessures, et ces précurseurs sont ensuite clivés pour libérer les peptides. Actuellement on distingue six grandes classes d'éliciteurs peptidiques endogènes : la systémine, les membres de la famille Plant Elicitor Peptide (Pep), l'hydroxyproline rich systemin (Hypsys), l'inceptine, le subpep et le peptide GmPep914 (Tableau 1 ; Yamaguchi et Huffaker 2011 ; Yamaguchi *et al.*, 2011). Ces peptides seraient des éliciteurs secondaires du système immunitaire, qui interviennent après la détection de PAMP ou DAMP pour amplifier les réponses de défense au sein de la cellule infectée et également éliciter le PTI dans les cellules environnantes (Figure 7).

Chapitre I

(I) Peptides from precursor proteins without an N-terminal secretion signal



(II) Peptides from precursor proteins with an N-terminal secretion signal



(III) Cryptic peptides derived from proteins with separate primary functions

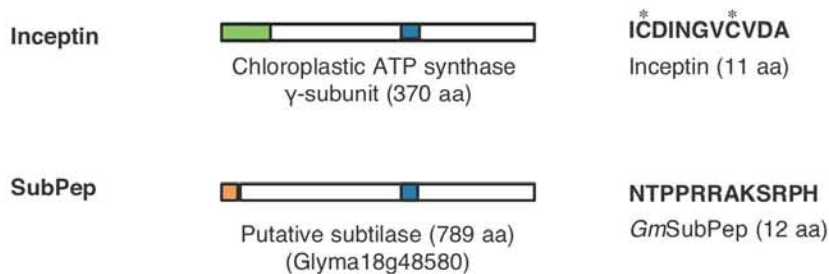


Figure 6. Les éliciteurs peptidiques endogènes chez les plantes

Des membres représentatifs de chacune des cinq familles d'éliciteurs peptidiques endogènes connus de plantes sont représentés, ainsi que leurs précurseurs, leur composition en acides aminés et les espèces chez lesquels ils ont été identifiés. Les O rouges indiquent les hydroxyprolines et les astérisques indiquent les cystéines impliquées dans des ponts disulfure. Les peptides clivés à partir du précurseur sont indiqués en bleu, les peptides de sécrétion apoplastique en orange et le peptide de localisation chloroplastique en vert.

Yamaguchi et Huffaker., Current Opinion in Plant Biology, 2011

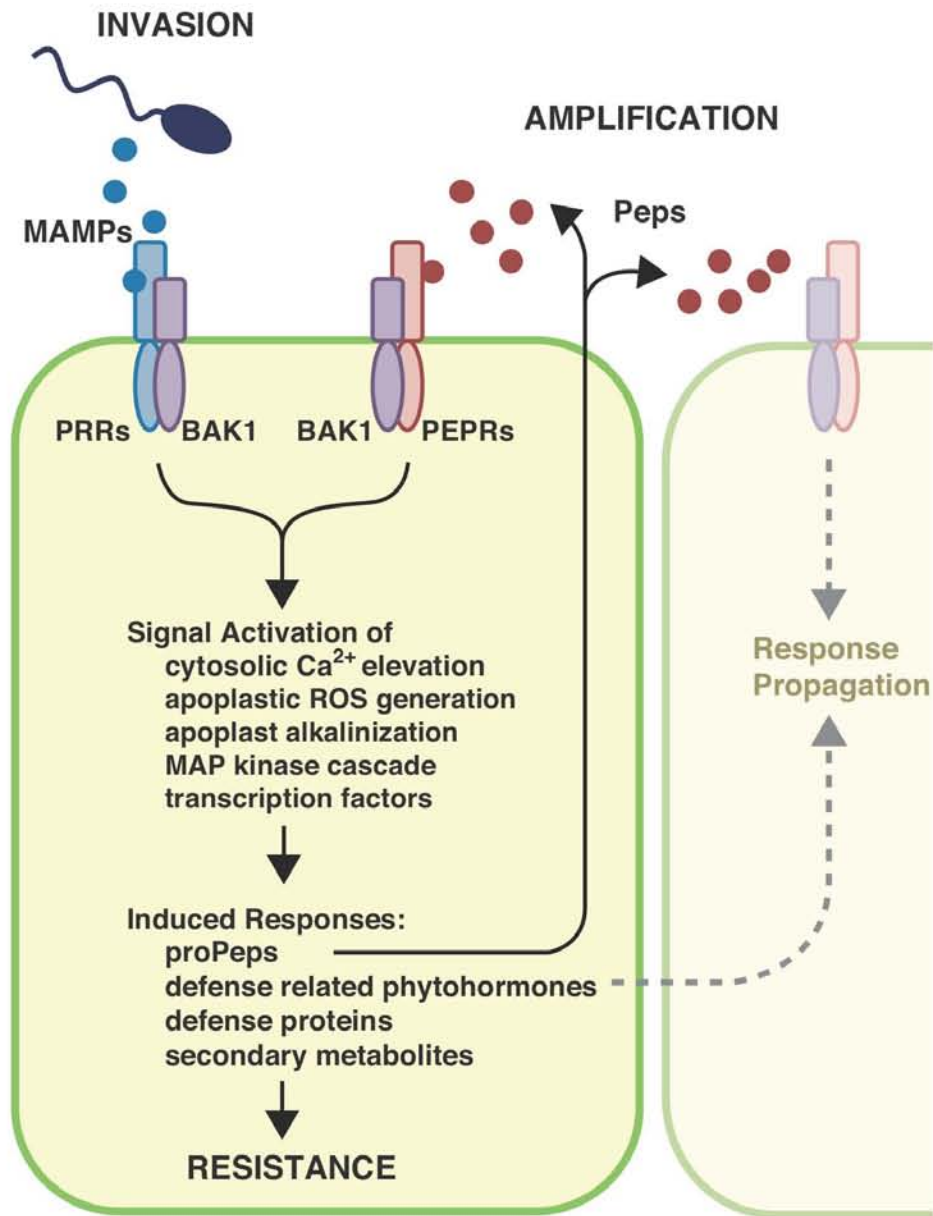


Figure 7. Modèle d'amplification des réponses de défense par les éliciteurs peptidiques endogènes

La perception de MAMP par les PRR du système immunitaire entraîne une signalisation et la mise en place de réponses de défense. Les éliciteurs peptidiques endogènes tels que les PEP (plant elicitor peptides) sont un des composant de ces mécanismes de défense, qui vont être libérés dans l'espace extracellulaire pour amplifier le signal de défense en étant reconnu par les PEPR (PEP receptors) de manière autocrine (au sein de la même cellule) ainsi que par les cellules avoisinantes.

Yamaguchi et Huffaker., Current Opinion in Plant Biology, 2011

2.1.3. Les PRR, sentinelles des frontières cellulaires

Les PAMP présents dans l'espace extracellulaire sont reconnus par des récepteurs de la membrane plasmique appelés PRR (Monaghan et Zipfel 2012). Ces PRR appartiennent généralement à la famille des receptor-like kinases (RLK) ou des receptor-like proteins (RLP) qui se différencient respectivement par la présence ou non d'un domaine kinase cytoplasmique. RLK et RLP possèdent un large domaine extracellulaire porteur le plus souvent de domaines répétés riches en leucine (LRR, leucine-rich repeat) ou de motifs lysine (LysM) qui interagissent préférentiellement avec des ligands de nature protéique et saccharidique, respectivement (Monaghan et Zipfel 2012). Actuellement, une dizaine de couples éliciteurs/récepteurs ont été identifiés, essentiellement entre des PRR d'arabidopsis ou de riz et des éliciteurs bactériens (Figure 8). Certains de ces couples, tels que la flagelline et son récepteur LRR-RLK FLS2 ou le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) et son récepteur LRR-RLK EFR, ont été étudiés de manière approfondie ces dernières années. Ils sont couramment utilisés aujourd'hui en laboratoire comme modèles pour disséquer les mécanismes de l'immunité ou en biotechnologie pour améliorer les résistances des cultures (Schwessinger *et al.*, 2011 ; Lacombe *et al.*, 2010). La reconnaissance de la flagelline par FLS2 a permis de dresser un modèle d'activation des PRR selon lequel, suite à l'interaction directe PRR-ligand, le signal de reconnaissance est transmis dans le cytoplasme. Des événements d'homo- et hétéro-dimérisation des récepteurs et de multiples événements de trans-phosphorylation entre domaines intracellulaires des PRR et des protéines kinases cytoplasmiques comme BIK1 (botrytis-induced kinase 1) contribuent à la mise en place de cette signalisation (Segonzac et Zipfel 2011 ; Sun *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2012). A ce niveau, le récepteur de type LRR-RLK BAK1 (brassinosteroid insensitive 1-associated kinase) apparaît comme un régulateur central de ces mécanismes, de par sa capacité à former des hétéroduplexes avec la majorité des PRR d'une manière dépendante de la fixation d'un ligand (Kemmerling *et al.*, 2011 ; Figure 5A). La protéine BAK1 est également impliquée dans les mécanismes de signalisation des brassinostéroïdes et pourrait être un médiateur majeur à l'intersection des mécanismes développementaux et immunitaires.

2.1.4. L'identification des couples PAMP/PRR

Le répertoire des couples éliciteur/récepteur connus reste à l'heure actuelle extrêmement pauvre compte tenu du très grand nombre de molécules microbiennes et des centaines de récepteurs de la membrane plasmique identifiés chez les plantes.

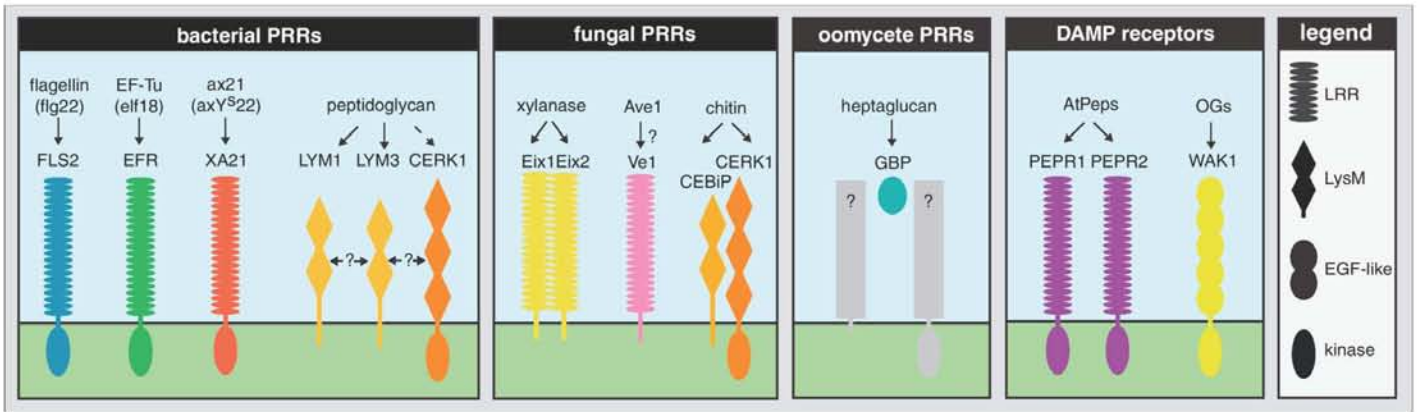


Figure 8. Les couples PRR/ligands

Les RLK (receptor-like kinases) ou RLP (receptor-like proteins) possèdent des domaines extracellulaires de type LRR ou LysM (lysine motif) et reconnaissent des PAMP bactériens (flagelline [flg22], facteur d'élongation [EF-Tu], peptide sulfaté ax21, peptidoglycanes), fongiques (xylanase, protéine ave1, chitine) ou d'oomycètes (heptaglucanes). Ils peuvent également reconnaître des DAMP de la plante tels que les PEP d'arabidopsis (AtPeps) ou encore des fragments d'acide oligogalacturonique des parois végétales.

Monaghan et Zipfel, *Current Opinion in Plant Biology*, 2012

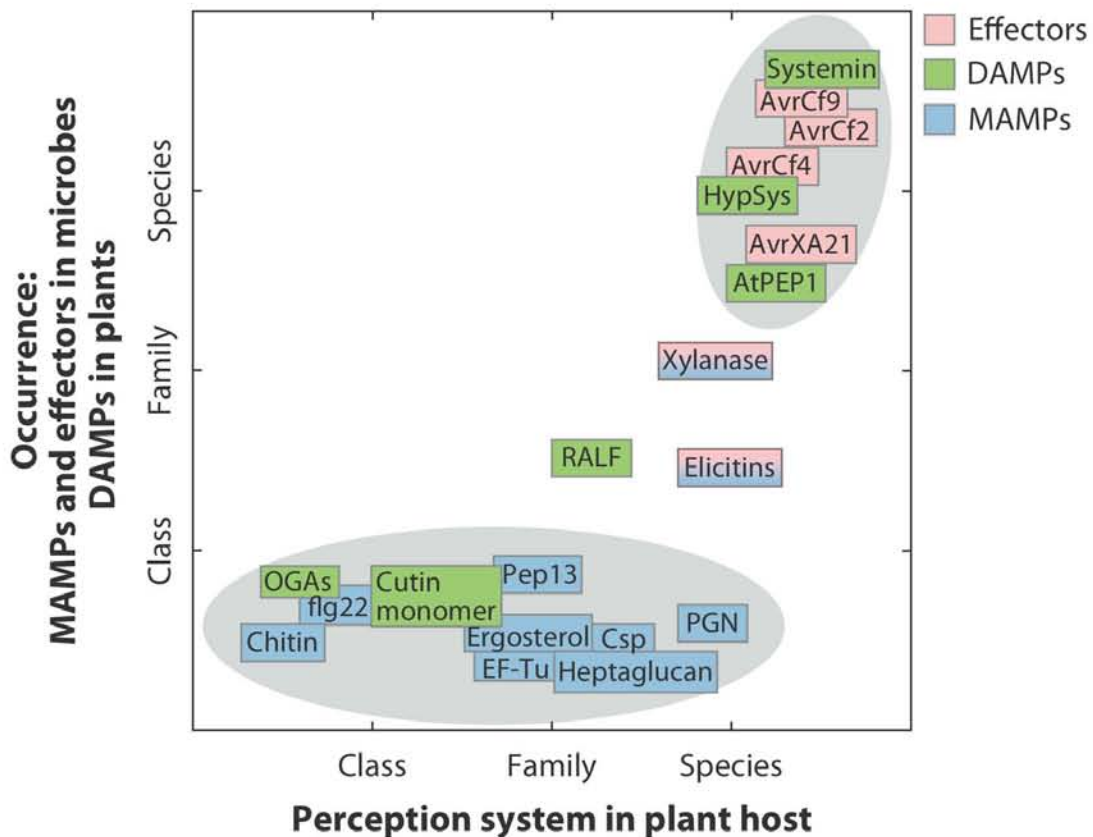


Figure 9. Spécificité des MAMP, DAMP et systèmes de reconnaissance végétaux

Les MAMP sont généralement universellement présents au sein d'un large groupe taxonomique de microbes, tandis que leur reconnaissance par les plantes est plus hétérogène. De la même manière, la perception des DAMP peut être universelle comme pour l'OGA (oligogalacturonic acid) ou hautement spécifique comme pour la systémine. Les effecteurs présentent également ce schéma de répartition présence/reconnaissance hautement spécifique.

Boller et Felix, *Annual Reviews in Plant Biology*, 2009

L'identification de nouveaux éliciteurs et de leurs récepteurs associés est actuellement une priorité de recherche (Zipfel et Robatzek 2010). La répartition des PAMP chez les microbes et DAMP chez les plantes n'est pas universelle, de même que la capacité des plantes à les reconnaître via les PRR. Par exemple, la systémine est spécifiquement reconnue par certaines espèces de Solanacées, tandis que le facteur d'élongation bactérien Ef-Tu ou encore le peptide ax21 de *Xanthomonas* spp. ne sont respectivement reconnus que par certaines Brassicacées et certains cultivars de riz (Figure 9). Dans le cas de la flagelline, cette capacité de reconnaissance fut acquise au cours de l'évolution de manière convergente chez les plantes et les animaux (Gomez-Gomez et Boller 2002). Cela suggère que la perception des éliciteurs par les plantes est le fruit d'une forte dynamique co-évolutive avec leur cortège de microorganismes associés. McCann et collaborateurs ont récemment utilisés les signatures laissées par cette co-évolution au sein de génomes de *P. syringae* pour identifier de nouveaux PAMP (McCann et al., 2012). Au-delà des PRR reconnaissant les PAMP, un très grand nombre de récepteurs des membranes plasmiques reconnaissent des protéines et peptides de plante pour réguler des processus développementaux (Butenko et al., 2009). L'identification et la caractérisation des couples ligand-récepteur devraient offrir une vision intégrée de la façon dont les cellules perçoivent leur environnement et y répondent, notamment par la modulation de leur développement et de leur immunité.

2.2. Voies de signalisation menant au PTI

Suite à la reconnaissance de ligands via les PRR, s'ensuit un ensemble de réponses physiologiques qui constituent les voies de signalisation du PTI. Généralement, on distingue les réponses quasi-immédiates (cinq minutes après élicitation) et les réponses précoces (dans les 30 minutes après élicitation) qui aboutissent finalement à la régulation des gènes.

2.2.1. Voies activées de manière quasi-immédiate

Dans les premières minutes suivant la détection d'un éliciteur, trois réponses physiologiques interviennent : un flux d'ion permettant une entrée de calcium dans les cellules, la génération massive et transitoire d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species ; ROS) et l'activation de plusieurs types de protéine kinases (Boller et Felix, 2009 ; Chinchilla et Boller 2012 ; Schwessinger et Ronald, 2012 ; Figure 10). Le calcium est un signal non spécifique qui joue un rôle de second messenger dans le

cytoplasme et qui contrôle plusieurs processus distincts. Notamment, plusieurs kinases CDPK (calcium-dependent protein kinases) sont activées par le calcium et sont impliquées dans la génération de ROS et l'expression des gènes de défense chez *Arabidopsis* (Boudsocq *et al.*, 2010). La production de ROS intervient également de manière très précoce. Cette production est assurée notamment par des NADPH oxydases de la membrane plasmique ou encore certaines peroxydases (Suzuki *et al.*, 2010). Tout comme pour le calcium, les ROS sont des médiateurs aspécifiques dont le rôle dans les mécanismes de signalisation reste mal compris. Toutefois, en modifiant le statut redox des résidus cystéinyles, les ROS activent des facteurs et cofacteurs de transcription, permettant l'induction de l'expression des gènes de défense (Spoel et Loake 2011). D'autre part, les ROS stimulent la fermeture des stomates et l'oxydation des parois cellulaires, ce qui permet d'imposer des barrières physiques aux parasites. Enfin, leur toxicité directe envers les microbes est également un moyen de limiter l'infection, ce qui est illustré par le fait que le champignon *M. oryzae* requiert l'activité de détoxification de glutathion peroxydases pour être complètement virulent sur son hôte (Huang *et al.*, 2011). Les cascades de phosphorylation assurées par les mitogen-activated protein kinases (MAPK) jouent également un rôle clef dans l'activation des réponses de défense des plantes (Pitzschke *et al.*, 2009). Notamment, les MAPK3 et MAPK6 chez *Arabidopsis* activent des facteurs de transcription de type WRKY qui induisent alors l'expression des gènes de défense (Asai *et al.*, 2002). D'une manière plus générale, il semble que l'activation des cascades MAPK soit suivie d'un changement du statut de phosphorylation d'un grand nombre de protéines dans la cellule, comme par exemple les NADPH oxydases impliquées dans la génération de ROS (Nühse *et al.*, 2007).

2.2.2. Voies activées de manière précoce

Dans la demi-heure qui suit l'élicitation, deux nouvelles réponses physiologiques interviennent : la production massive d'éthylène et l'endocytose des PRR. L'éthylène est une des principales hormones impliquées dans les réponses de défense. Sa production intervient suite à l'activation des 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthases par les MAPK. Outre l'activation des gènes de défense, l'éthylène active aussi le facteur de transcription EIN3 (ethylene insensitive 3) qui régule positivement l'expression de FLS2 (Boutrot *et al.*, 2010). Cette observation a permis de suggérer que l'éthylène joue un rôle dans une boucle positive d'induction des gènes codant les PRR, permettant leur accumulation lors du PTI (Chinchilla et Boller 2012). Suite à l'élicitation par la flagelline,

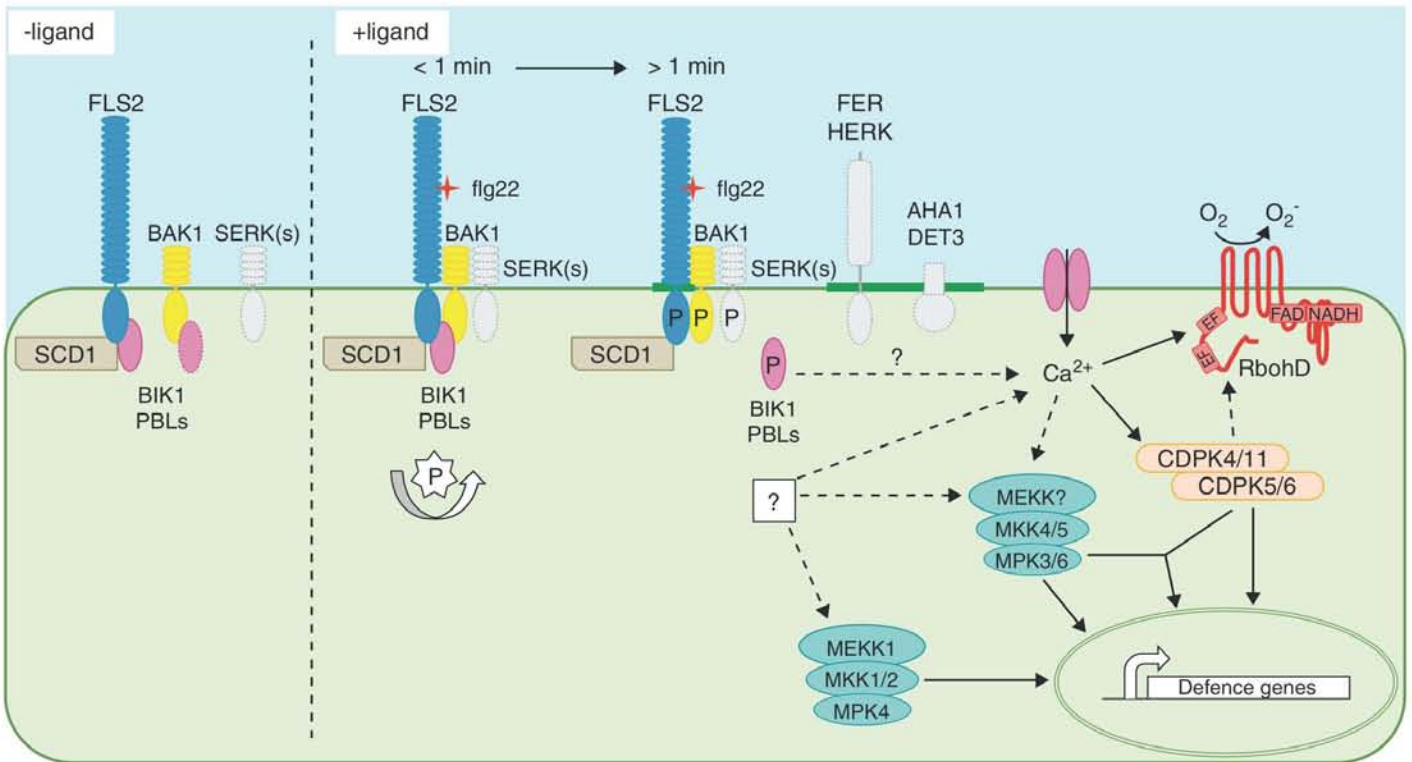


Figure 10. Activation des PRR et réseau de signalisation du PTI

Modèle actuel de la voie de signalisation de FLS2 chez arabidopsis. En absence de ligand, FLS2 et d'autres récepteurs sont dans un état dit 'off'. Suite à la détection d'un ligand, FLS2, BAK1 et d'autres protéines membranaires forment un complexe au niveau de la membrane plasmique, dont les domaines cytoplasmiques subissent de multiples événements de trans-phosphorylation. Cela active le réseau de signalisation du PTI, notamment l'entrée de calcium dans la cellule, la génération de ROS, l'activation de différents kinases et cascades de phosphorylation cytoplasmiques menant à l'induction de l'expression des gènes de défense. *Segonzac et Zipfel, Current Opinion in Microbiology, 2011*

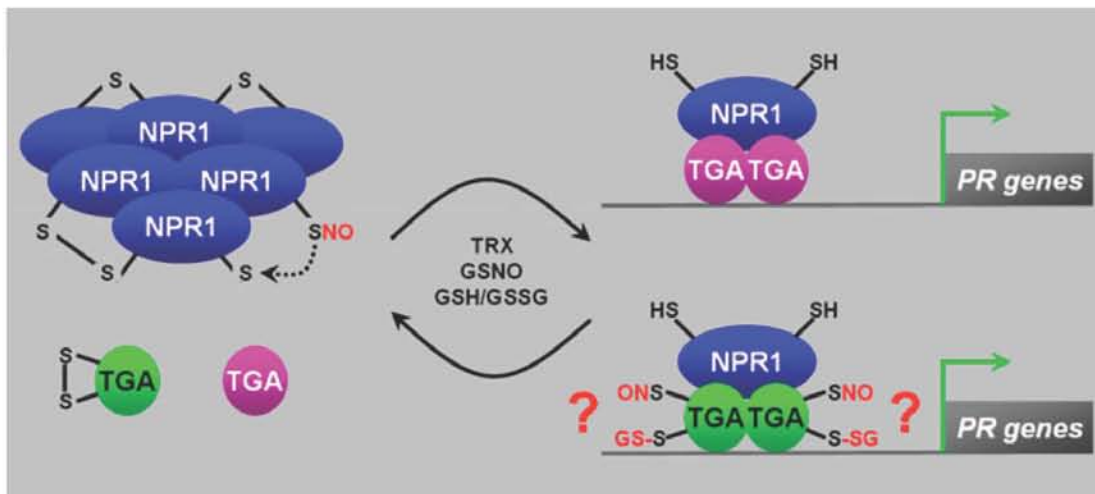


Figure 11. Modèles d'activation de l'expression des gènes de défense par NPR1

Les changements redox modifient l'activité du co-activateur NPR1 (non-expressor of PR1), le faisant passer d'un état inactif oligomérique à un état actif monomérique via une S-nitrosylation des cystéines, qui facilite leur réduction par des thiorédoxines. L'interaction des monomères de NPR1 avec les facteurs de transcription de type TGA active l'expression des gènes encodant des protéines PR. Certains TGA (en vert) doivent être dans un état réduit pour être actif et interagir avec NPR1, la S-nitrosylation de leurs cystéines semble favoriser leur liaison à l'ADN.

Moore et al., The Plant Cell, 2011

FLS2 est internalisé par endocytose (Beck *et al.*, 2012). La fonction de ce mécanisme dans le PTI reste assez mal comprise, mais certains auteurs ont suggéré que l'endocytose suivie de la dégradation du récepteur activé pourraient avoir un rôle dans le contrôle négatif de l'activation du PTI (Robatzek *et al.*, 2006). En effet, dans la mesure où les réponses de défense sont antagonistes de la croissance, les plantes régulent finement leur immunité afin d'éviter une sur-activation délétère (Alcazar *et al.*, 2011). La récente démonstration que les ubiquitine ligases PUB 12 et PUB 13 ciblent FLS2 pour le dégrader d'une manière dépendante de la liaison de la flagelline renforce l'idée de l'existence d'une boucle de contrôle négatif du PTI basée sur la dégradation des PRR (Lu *et al.*, 2011). Finalement, au-delà de l'éthylène, une étude portant sur la sensibilité de mutants d'arabidopsis pour les voies de biosynthèse de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique a permis de révéler que ces hormones jouent également un rôle dans les voies de signalisation du PTI (Katagiri *et al.*, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2012).

2.2.3. La régulation des gènes

Une demi-heure après une exposition aux PAMP ou à certains microbes, une reprogrammation de l'expression génique est observée chez la plante. Le suivi de ces modifications à l'échelle du transcriptome a été une étape décisive pour la compréhension des réponses de défense, notamment en répertoriant l'ensemble des gènes de défense dont l'expression est induite lors des infections (Wise *et al.*, 2007). Différents éliciteurs induisent l'expression des mêmes gènes, indiquant que les voies de signalisation du PTI convergent vers les mêmes réponses de défense (Zipfel *et al.*, 2006). Notamment, l'expression de nombreux PRR est induite par les éliciteurs, ce qui suggère une boucle positive de stimulation des PRR pour maintenir les capacités de reconnaissance (Boller et Felix 2009). Plus généralement, NPR1 (non-expressor of PR-1) est un régulateur central de l'expression des gènes de défense codant les protéines PR. Dans les tissus non infectés, NPR1 est séquestré dans le cytoplasme sous une forme oligomérique via des ponts disulfure intermoléculaires. Suite à une infection ou à une élicitation, la balance redox modifiée et l'action de thiorédoxines entraînent la libération de monomères de NPR1 (Mou *et al.*, 2003). Ces monomères entrent dans le noyau où ils se lient aux facteurs de transcription TGA qui vont alors induire l'expression des gènes de défense, conjointement avec les facteurs de transcription WRKY (Moore *et al.*, 2011 ; Tada *et al.*, 2008). A la manière des PRR qui sont dégradés pour éviter la sur-activation des défenses, NPR1 subit une dégradation dépendante du protéasome quand il se trouve

dans le noyau (Spoel *et al.*, 2009). Dans ce processus d'expression des gènes de défense, l'acide salicylique (SA) est également un médiateur important, bien que sa contribution au PTI reste mal déterminée (Vlot *et al.*, 2009). De même, le monoxyde d'azote (NO ; nitric oxide) est un module émergent dans la compréhension des voies de signalisation du PTI. Notamment, son rôle dans la S-nitrosylation des résidus cystéinyles de NPR1 ou de facteurs de transcription TGA semble contribuer à la transition de ces protéines d'un état inactif vers un état actif (Spoel et Loake 2011 ; Gaupels *et al.*, 2011 ; Figure 11). Il est apparu récemment que la S-nitrosylation des NADPH oxydases membranaires permet de limiter la production de ROS par ces enzymes (Yun *et al.*, 2011). Ainsi, le NO serait un médiateur pouvant à la fois stimuler et réprimer les réponses de défense (Yu *et al.*, 2012). En plus des gènes codant les protéines PR, d'autres gènes sont également typiquement induits lors du PTI, notamment les gènes codant des PRR, des précurseurs des éliciteurs peptidiques endogènes, des facteurs de transcription, des protéines impliquées dans la détoxification des ROS ou encore des enzymes du métabolisme secondaire (Eulgem *et al.*, 2004 ; Wise *et al.*, 2007 ; Yamaguchi et Huffaker 2011).

2.3. Les réponses de défense

On regroupe sous le terme de réponses de défense, les mécanismes inductibles qui permettent d'établir une résistance effective à un parasite. Cela inclut des molécules antimicrobiennes qui peuvent être de nature protéique (protéines PR et peptides antimicrobiens) ou des métabolites secondaires (phytoalexines). A l'échelle cellulaire, le trafic vésiculaire permet une sécrétion focalisée de ces molécules toxiques aux sites d'infection, ainsi que le dépôt de callose pour limiter physiquement la progression des parasites.

2.3.1. Les protéines antimicrobiennes

Les protéines PR sont communément induites dans les tissus infectés par les bactéries, les oomycètes ou les champignons parasites, et se répartissent en 17 familles (PR-1 à PR-17) selon leurs homologies de séquences (Van Lon et Van Strien 1999 ; Tableau 2). Certaines familles de protéines PR comme les thaumatin-like protein (TLP, famille des PR-5) sont très abondantes dans certains produits de consommation courante et sont utilisées dans l'industrie pour d'autres propriétés que leurs activités antimicrobiennes (Encadré 1). Les gènes des familles PR codent par exemple des glucanases (PR-2 et 5), des chitinases (PR-3, 4, 8 et 11), des protéases (PR-7) ou encore des inhibiteurs de

Tableau 2. Les protéines PR

Family	Type member	Typical size (kDa)	Properties	Proposed microbial target
PR-1	Tobacco PR-1a	15	Antifungal	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	30	β -1,3-Glucanase	β -1,3-Glucan
PR-3	Tobacco P, Q	25-30	Chitinase (class I,II, IV,V,VI,VI)	Chitin
PR-4	Tobacco 'R'	15-20	Chitinase class I,II	Chitin
PR-5	Tobacco S	25	Thaumatococin-like	Membrane
PR-6	Tomato Inhibitor I	8	Proteinase-inhibitor	- ^a
PR-7	Tomato P ₆₉	75	Endoproteinase	- ^a
PR-8	Cucumber chitinase	28	Chitinase class III	Chitin
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	35	Peroxidase	- ^a
PR-10	Parsley 'PR1'	17	'Ribonuclease-like'	- ^a
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	40	Chitinase class I	Chitin
PR-12	Radish Rs-AFP3	5	Defensin	Membrane
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	5	Thionin	Membrane
PR-14	Barley LTP4	9	Lipid-transfer protein	Membrane
PR-15	Barley OxOa (germin)	20	Oxalate oxidase	- ^a
PR-16	Barley OxOLP	20	'Oxalate oxidase-like'	- ^a
PR-17	Tobacco PRp27	27	Unknown	- ^a

Les protéines PR (pathogenesis-related) sont induites dans les tissus infectés des plantes et participent aux réponses de défense. Elles ont été regroupées en 17 classes, de PR-1 à PR-17.

^aAucune activité antimicrobienne *in vitro* n'a été rapportée
Sels et al., *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008

Encadré 1. Les thaumatococins (TLP) dans les produits de consommation courante

La thaumatococine est une protéine qui fut découverte dans le fruit du Katemfe (*Thaumatococcus daniellii*) en 1972 par des chercheurs d'Unilever®. En plus de son activité antifongique, elle présente un très fort pouvoir sucrant et une forte capacité à modifier les goûts en masquant l'amertume. Ces propriétés sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, où la thaumatococine est commercialisée sous le nom de Talin®. Le Talin est notamment incorporé dans la nourriture (desserts, chewing-gum, bonbons), les boissons (sodas, boissons alcoolisées), les médicaments (sirops pour la toux, analgésiques, antibiotiques) ou encore les produits d'hygiène comme le dentifrice. D'autre part, les TLP sont parmi les protéines les plus abondantes dans les fruits (pommes, bananes, pêches, cerises, raisin, ...). Elles se retrouvent de fait dans notre alimentation et participent vraisemblablement au goût sucré des fruits que l'on consomme. Leur abondance dans le raisin en font les protéines les plus abondantes dans le vin et entraînent parfois des dépôts indésirables dits brumeux dans les bouteilles. Enfin, comme d'autres protéines PR, les TLP sont des agents allergènes majeurs des fruits et sont à ce titre des modèles d'étude des déterminants protéiques allergènes.

protéases (PR-6 ; [Van Loon et al., 2006](#)). D'autre part, on distingue également des peptides antimicrobiens à large spectre tels que les défensines (PR-12), les thionines (PR-13) et les LTP (lipid transfer protein, PR-14). Avec l'analyse des premiers génomes de plantes séquencés, il est clairement apparu que les protéines PR formaient d'importantes familles multigéniques, comprenant de quelques gènes à plusieurs centaines de membres ([Silverstein et al., 2005](#)). Un si grand nombre de protéines suggère une certaine redondance fonctionnelle mais également certaines spécificités de localisation tissulaire, d'expression ou d'activité biochimique.

2.3.2. Les peptides antimicrobiens

Les peptides des familles PR-12, PR-13 et PR14 constituent avec d'autres peptides des familles des cyclotides, snakines ou protéines similaires aux hévéines l'arsenal des peptides antimicrobiens (AMP, antimicrobial peptide) chez les plantes ([Hammami et al., 2008](#) ; [Marcos et al., 2008](#)). L'activité antimicrobienne des protéines PR et AMP est caractérisable de manière directe *in vitro*, à partir de protéines purifiées capables d'inhiber la croissance des microorganismes. De manière indirecte, l'activité antimicrobienne est souvent mise en évidence *in vivo* via des mutants sur-expresseurs de ces protéines ou peptides qui présentent une plus forte résistance aux agents pathogènes ([Figure 12](#)). Généralement, les AMP végétaux sont petits, sécrétés, riches en ponts disulfure, et s'accumulent fortement dans les tissus infectés ([Pelegriani et al., 2011](#), [Van Loon et al., 2006](#)). Ils sont le plus souvent cationiques (i.e. chargés positivement), ce qui leur permet d'interagir physiquement avec les membranes microbiennes chargées négativement, et sont parfois appelés CAMP (cationic AMP) par certains auteurs. On retrouve ces mêmes propriétés chez les AMP d'autres eucaryotes qui perturbent les membranes et entraînent la lyse des cellules microbiennes ([Sels et al., 2008](#)). Il est probable que la co-évolution des AMP avec les systèmes de défense des microbes ait favorisé l'enrichissement en charges positives et en ponts disulfure, respectivement pour renforcer l'interaction avec les membranes et résister aux dégradations par des protéases ([Peschel et Sahl 2006](#) ; [Figure 13](#)). Contrairement aux AMP de plantes qui présentent des structures tridimensionnelles bien définies, beaucoup d'AMP d'eucaryotes ne possèdent pas de structure tridimensionnelle rigide ([Zasloff 2002](#)). Ces derniers présentent en effet un état intrinsèquement désordonné en milieu aqueux et adoptent des structures secondaires en hélices alpha uniquement au contact des membranes microbiennes dans lesquelles ils s'insèrent ([Haney et al., 2009](#)). Outre la

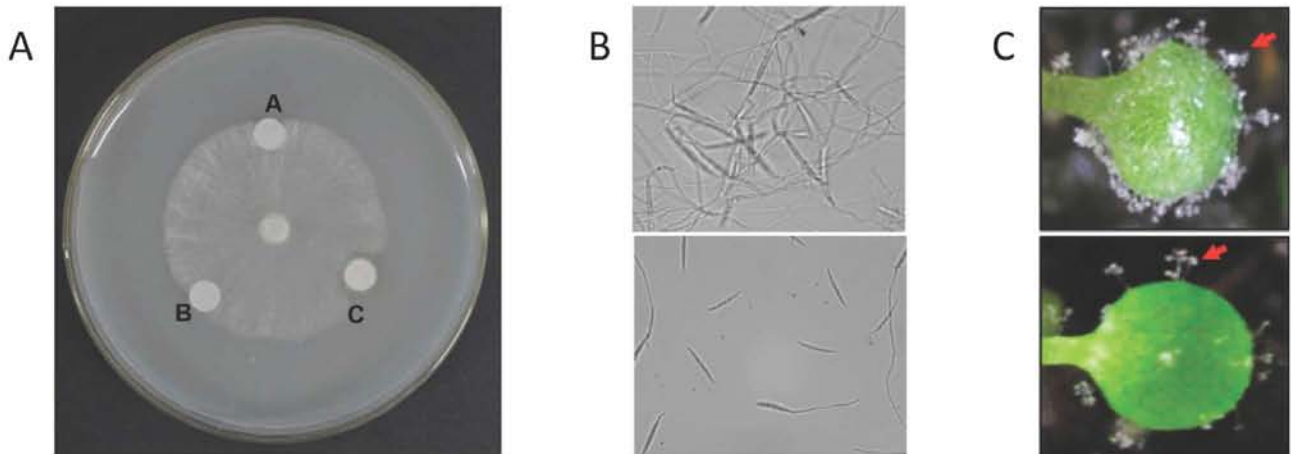


Figure 12. Méthodes de démonstration de l'activité antimicrobienne des protéines et peptides

(A) Activité antifongique d'une PR-5 (thaumatin-like protein), purifiée à partir de graines de *Cynanchum Komarovii*, envers le champignon *Valsa mali*. A: tampon phosphate, B: protéines totales de graines dénaturées à la chaleur, C: 10 µg de PR-5 purifiée. (B) Activité antifongique d'une β-1,3-glucanase de tabac qui inhibe la germination de spores de *Fusarium graminearum in vitro* (en bas) comparé à une condition contrôle correspondant à de la BSA (bovine serum albumin; en haut). (C) Mutant d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant ectopiquement la protéine antimicrobienne AMP1 de *Capsicum annum*, et présentant une résistance accrue à l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* (en bas, indiqué par les flèches rouges) comparé à la plante sauvage (en haut).

Adapté de Wang et al., PLoS ONE, 2011 / Anand et al., MPMI, 2004 / Lee et al., Plant Physiology, 2008

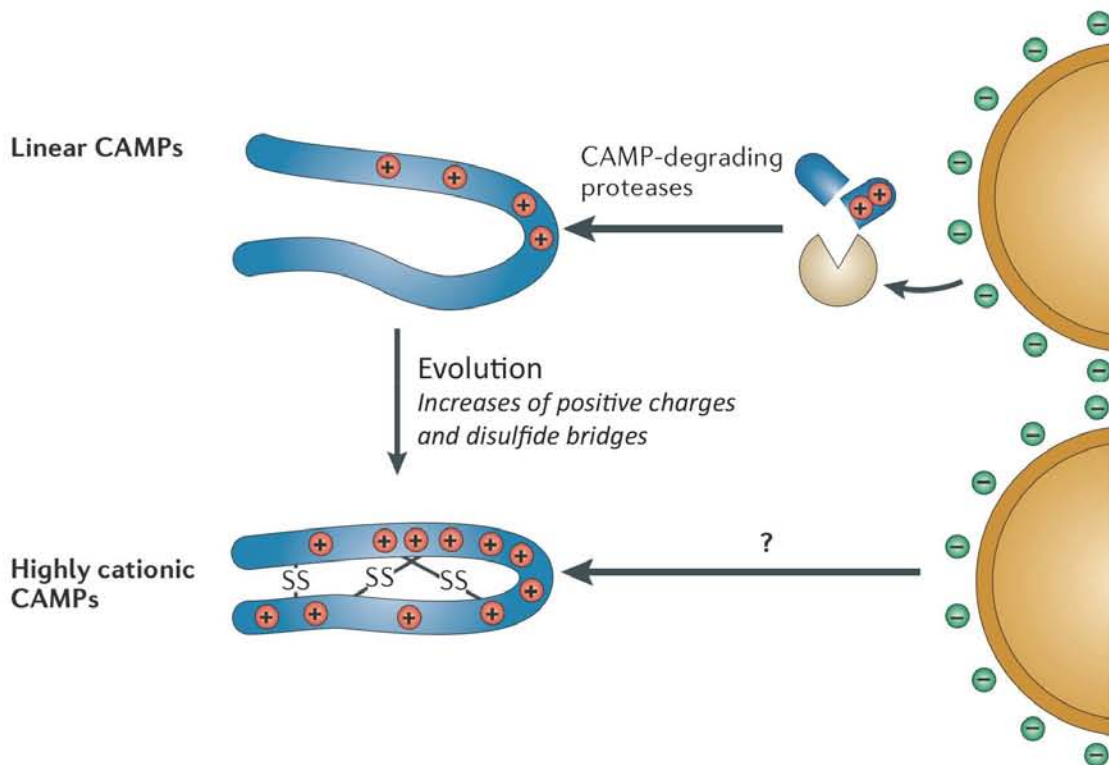


Figure 13. Les peptides cationiques antimicrobiens CAMP et leur évolution

Les charges positives des CAMP (cationic antimicrobial peptides) leur permettent d'interagir avec les membranes microbiennes chargées négativement. Les microbes utilisent des enzymes de dégradation pour lutter contre les CAMP. Au cours de l'évolution, la charge globale positive des CAMP a augmenté ce qui a pour effet de renforcer l'interaction avec les membranes, de même les ponts disulfure se sont accumulés, ce qui permet une meilleure résistance aux dégradations.

Figure adaptée de Peschel et Shal, Nature Reviews in Microbiology, 2006

perturbation des membranes, d'autres activités ont été rapportées, telles que la perturbation de l'architecture des parois microbiennes, la pénétration à l'intérieur du cytoplasme et l'inhibition de la réplication de l'ADN, de la machinerie transcriptionnelle ou encore de certaines activités enzymatiques microbiennes (Marcos *et al.*, 2008 ; Figure 14). A l'instar des plantes, les microorganismes possèdent des systèmes de défense inductibles pour faire face aux molécules antimicrobiennes végétales. Ces mécanismes reposent par exemple sur la sécrétion d'enzymes capables de dégrader les molécules de plantes comme la saponine, des métabolites secondaires ou encore des protéines PR (Morrissey et Osbourn 1999 ; Bouarab *et al.*, 2002 ; Naumann *et al.*, 2012).

2.3.3. Les métabolites antimicrobiens : les phytoalexines

On considère principalement trois classes de métabolites secondaires chez les plantes : les terpènes, les alcaloïdes et les phénols. Des composés appartenant à chacune de ces familles ont été décrits comme des molécules possédant une activité antimicrobienne (Dixon 2001). Les mieux caractérisés sont certainement les glucosinolates ou encore la camalexine (Bednarek 2012 ; Figure 15). Ces composés antimicrobiens ont été nommés phytoanticipines ou phytoalexines, selon qu'ils sont présents de manière constitutive ou qu'ils sont accumulés lors des infections, bien qu'actuellement le terme phytoalexine soit plus généralement utilisé pour se référer aux métabolites antimicrobiens (Bednarek et Osbourn 2009). A la manière des AMP, les phytoalexines exercent leur toxicité envers les cellules microbiennes via la perturbation des membranes ou l'inhibition de certains processus intracellulaires (Morrissey et Osbourn 1999). Récemment, plusieurs métabolites secondaires ont été identifiés qui semblent ne pas avoir d'activités antimicrobiennes et seraient davantage impliqués dans la modulation des réponses immunitaires, pour le dépôt de callose lors du PTI par exemple (Bednarek *et al.*, 2009 ; Clay *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que les métabolites secondaires interviennent à différents niveaux de l'immunité des plantes, comme agents antimicrobiens mais également comme molécules signaux et médiateurs des réponses de défenses. La présence d'un régulon du métabolisme secondaire conservé entre les dicotylédones et les monocotylédones suggère une implication ancienne des métabolites secondaires dans les défenses végétales, bien que certains groupes de phytoalexines comme les glucosinolates soient restreints aux Brassicacées, ce qui dans ce cas supporte plutôt une apparition récente au cours de l'évolution (Humphry *et al.*, 2010 ; Bednarek 2012).

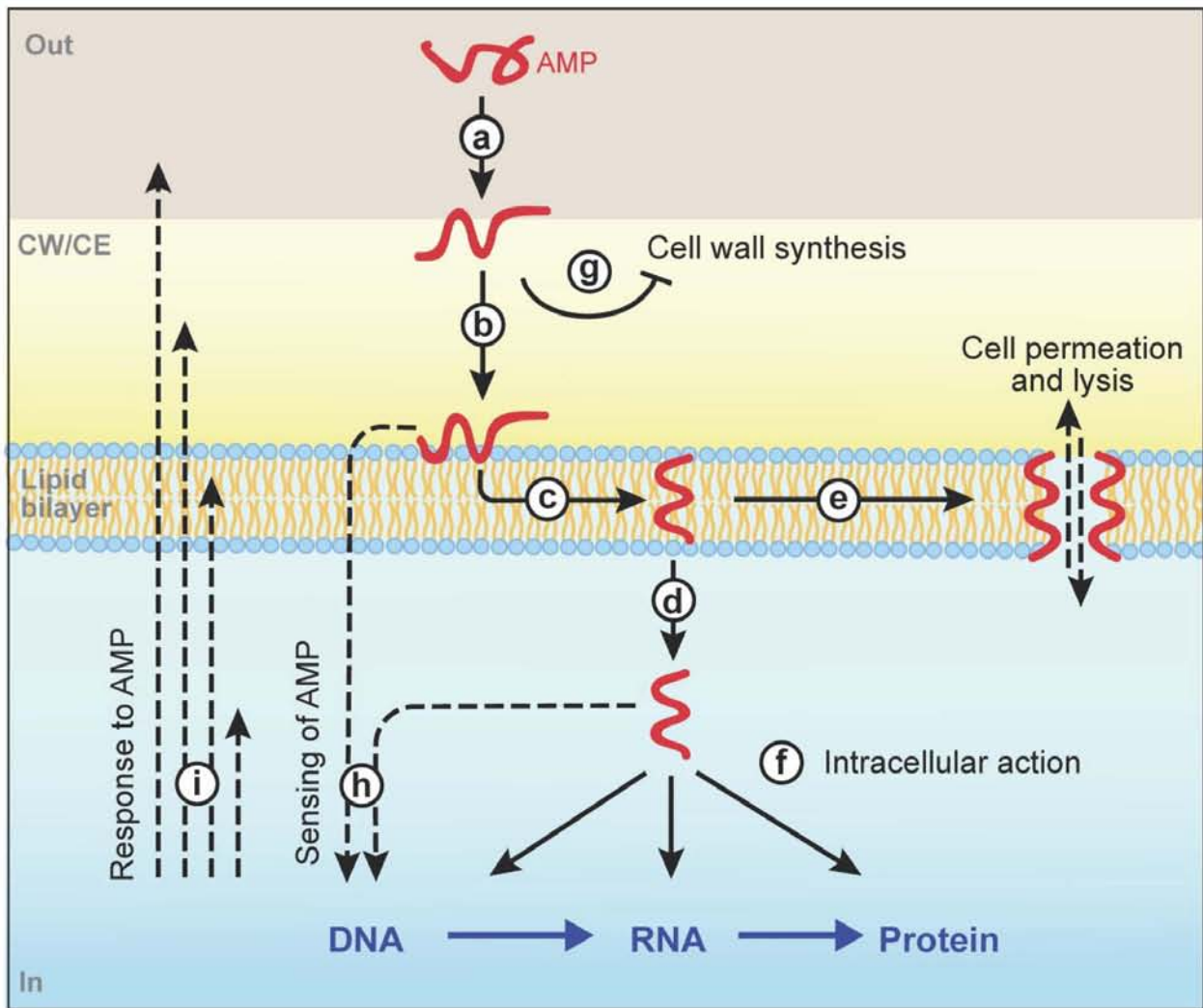


Figure 14. Interaction des peptides antimicrobiens avec leurs cibles

(a) Les AMP (antimicrobial peptide, en rouge), qui peuvent être non-structurés, interagissent avec l'enveloppe extérieure (CW/CE pour Cell Wall/Cell Envelope) de la cellule microbienne (In, en bleu) par des interactions électrostatiques. (b) Ils peuvent ensuite migrer au sein du CW et interagir avec les membranes, (c) où leurs propriétés biophysiques leur permettent de s'insérer dans celles-ci. Durant ces étapes, les AMP peuvent adopter des structures en hélices alpha. Une fois insérés dans les membranes, ils peuvent (d) transloquer dans la cellule hôte ou (e) perturber l'architecture membranaire menant à la perméabilisation des cellules. (f) Les AMP internalisés peuvent perturber des processus liés à la réplication de l'ADN, la transcription des ARN ou encore l'activité de certaines enzymes, menant à la mort de la cellule. (g) Certains AMP perturbent l'architecture ou la synthèse des parois en interagissant avec des composants de celles-ci. En retour, les microorganismes ont des récepteurs (h) capables de détecter et de signaler la présence d'AMP, ce qui entraîne une modification de l'expression des gènes et des réponses de défense aux AMP (i) et qui interviennent au niveau du cytosol, de la membrane, des parois cellulaires et de l'environnement de la cellule.

Marcos et al., Annual Reviews in Phytopathology, 2008

2.3.4. Sécrétion focalisée des molécules de défense et dépôt de callose

Au cours de l'infection, les champignons biotrophes pénètrent les cavités cellulaires à des points précis, qui sont la cible des vésicules de sécrétion des cellules végétales (Freidit frey et Robatzek 2009 ; Figure 15). Au niveau des sites de pénétration, ces vésicules libèrent de la callose, ainsi que des protéines PR et des métabolites secondaires. La callose est un polymère de glucane qui renforce la paroi cellulaire et lui permet de résister physiquement à la pénétration. Au niveau des haustoria (i.e. structures microbiennes qui s'invaginent dans les cellules hôtes), le dépôt de callose peut permettre de sceller ces structures pour stopper l'infection, bien que certains champignons semblent tirer profit de ces mécanismes pour stabiliser leurs haustoria au niveau de la fine jonction (ou col haustorial) qui permet de les relier aux structures d'infection dont ils sont issus (Hok et al., 2010). Les gènes *pen* (penetration) d'arabidopsis codent une syntaxine (*pen1*) impliquée dans la sécrétion des vésicules, une myrosinase (*pen2*) impliquée dans la biosynthèse de glucosinolates et un transporteur ABC (*pen 3*) impliqué dans la sécrétion de métabolites secondaires à travers la membrane plasmique (Figure 15). Les mutants *pen* d'arabidopsis ayant perdus la capacité de synthétiser des phytoalexines et/ou de les sécréter hors de la cellule sont plus sensibles aux agents pathogènes non-adaptés, ce qui prouve notamment leur importance dans les mécanismes de défense pré-invasifs permettant la résistance non-hôte (Lipka et al., 2008).

2.3.5. La multifonctionnalité des molécules de défense

Il a été souligné récemment une forte multifonctionnalité pour certaines protéines PR comme les TLP (PR-5) ou encore les défensines (PR-12) qui, outre la perturbation des membranes, peuvent inhiber des enzymes ou encore favoriser la résistance aux stress abiotiques (Liu et al., 2010a ; Franco 2011). De manière intéressante, certains AMP d'animaux tels que les défensines ou les cathélicidines sont également multifonctionnels. En effet, ces peptides peuvent stimuler positivement le système immunitaire animal et ainsi favoriser la résistance aux agents pathogènes, indépendamment de leur activité antimicrobienne (Hancock et Sahl 2006 ; Figure 16. Ces AMP ont été renommés peptides de défense de l'hôte ou HDP (host defense peptides). De par leur capacité à lutter contre les agents pathogènes de manière à la fois directe et indirecte, les HDP présentent actuellement des perspectives intéressantes dans le domaine médical, comme adjuvants dans les vaccins par exemple (Yeung et al., 2011). La démonstration biochimique de

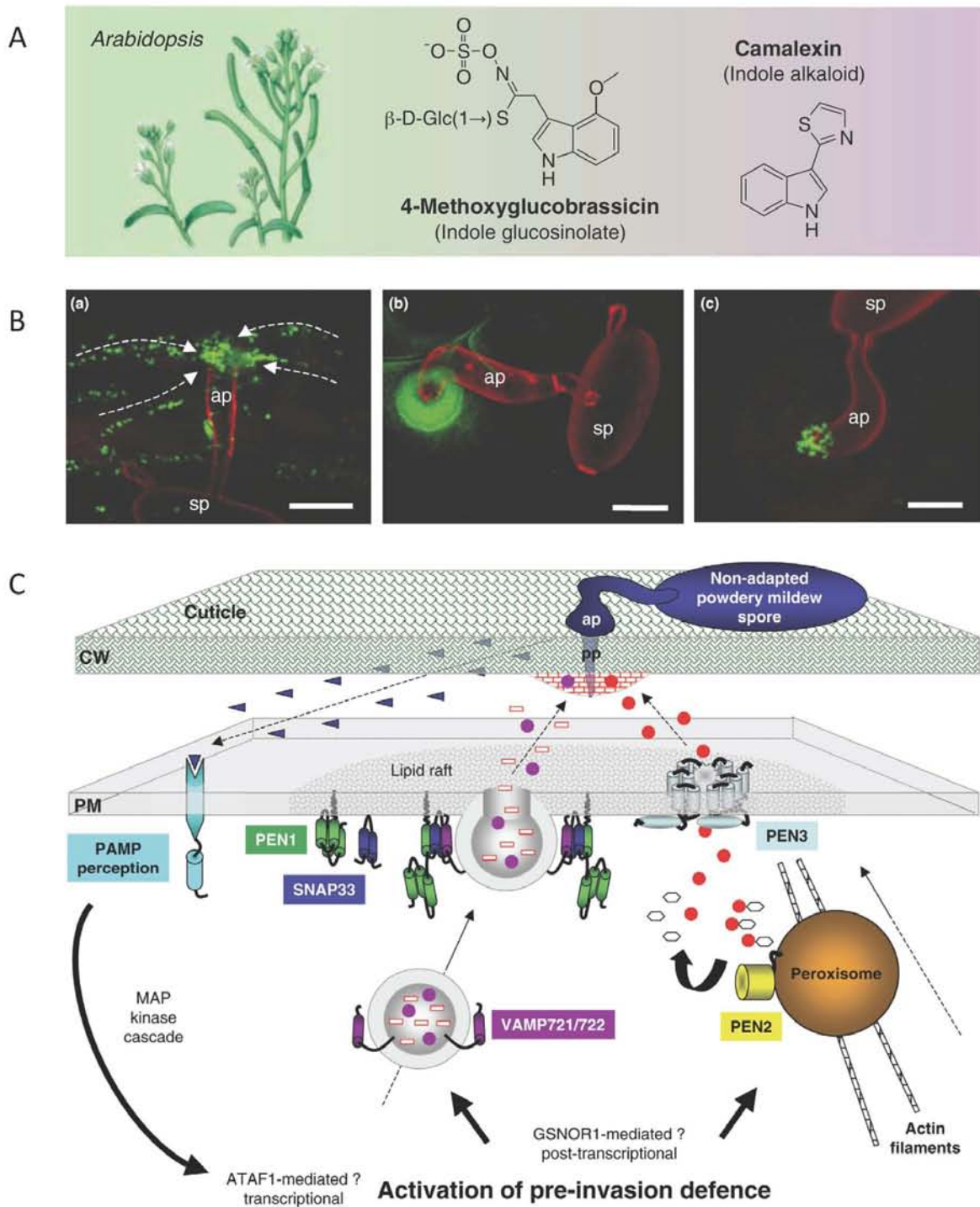


Figure 15. Les phytoalexines et leur sécrétion

(A) Formule chimique de deux métabolites secondaires d'arabidopsis (un glucosinolate et la camalexine). (B) Visualisation des mécanismes de pré-invasion focalisés au niveau des sites d'infection par des appressoria (ap) de spores (sp) de *Blumeria graminis* (en rouge) à l'aide de lignées d'arabidopsis exprimant des fusions GFP VAMP722 (a), PEN3 (b) ou PEN2 (c) en vert. (C) Représentation schématique des mécanismes pré-invasifs lors de la résistance non-hôte d'arabidopsis à *Blumeria graminis*. Suite à la reconnaissance de PAMP, la cellule met en place la production et la sécrétion focalisée de métabolites secondaires notamment grâce à PEN 1 (une syntaxine impliquée dans l'exocytose des vésicules), PEN2 (une myrosinase associée aux peroxysomes et impliquée dans la biosynthèse des glucosinolates) et PEN3 (un transporteur de type ABC qui permet la sécrétion transmembranaire des métabolites secondaires).

Adapté de Lipka et al., *Current Opinion in plant Science*, 2008 / Bednarek et Osbourn, *Science* 2009

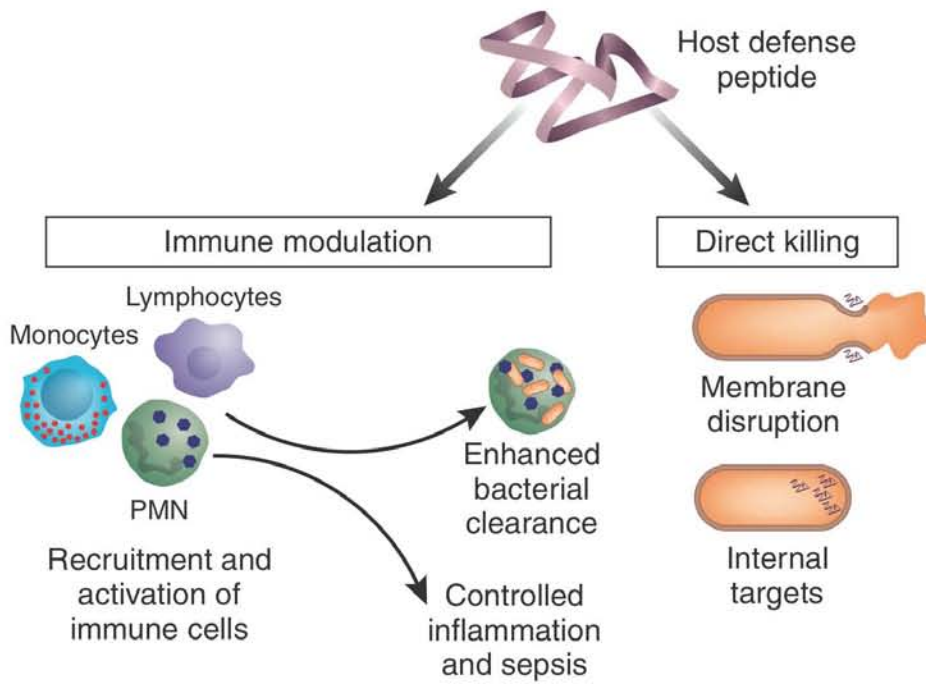


Figure 16. Multifonctionnalité des HDP

Les peptides de type HDP (host defense peptide) combinent les capacités de tuer directement certains microbes à la manière des AMP et de stimuler les réponses immunitaires.

Hancock et Sahl., Nature biotechnology, 2006

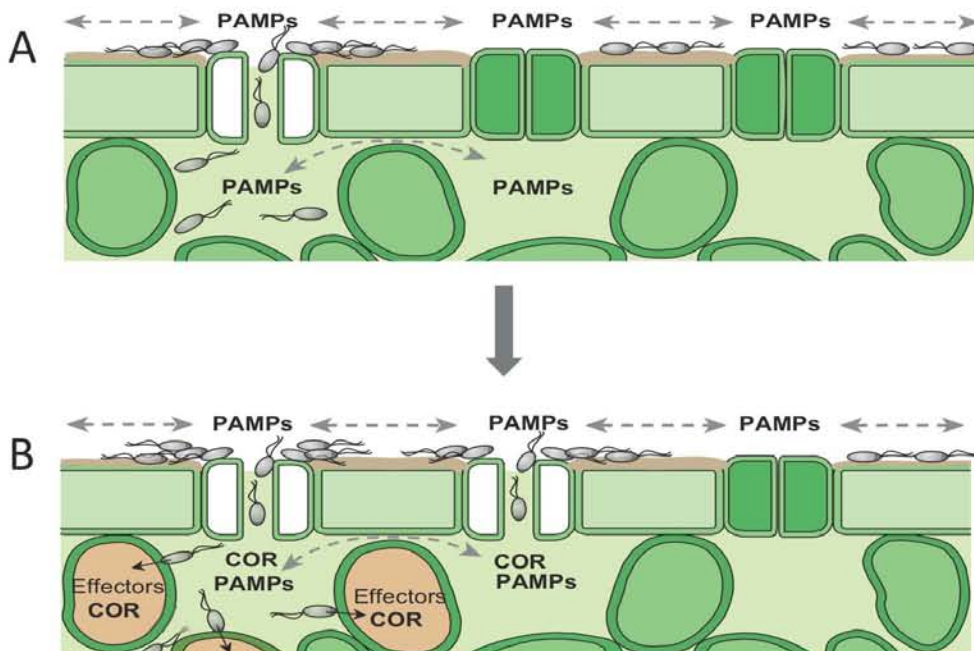


Figure 17. La fermeture des stomates comme mécanisme de défense face aux bactéries

(A) Dans l'heure qui suit la perception de PAMP, la plupart des stomates se ferment. Certains restent cependant ouverts, ce qui permet aux bactéries de pénétrer dans la feuille. (B) Après trois heures, les bactéries *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 présentes dans les tissus sécrètent un effecteur, la coronatine (COR), qui stimule la réouverture des stomates et l'entrée subséquente d'autres bactéries.

Meletto et al., Annual Reviews in Plant Biology, 2008

l'existence d'HDP chez les plantes n'a pas encore été effectuée. Cependant, des analogues fonctionnels non-protéiques des HDP sont présents chez les plantes. C'est le cas par exemple du phosphite (H_3PO_3) qui inhibe la croissance de parasites directement via un effet toxique et indirectement au travers de la modulation de l'immunité de l'hôte (Massoud *et al.*, 2012).

2.3.6. Réponses spatio-temporelles : au delà du cadre cellulaire

Le modèle en zigzag ainsi que les modèles qui s'en sont inspirés (Figures 4 et 5) ont conceptualisé le système immunitaire végétal au niveau d'une cellule unique. Toutefois, il existe des réponses de défense dont la portée dépasse les limites de la cellule. Par exemple, les stomates sont la principale voie d'accès à l'intérieur des tissus foliaires. Leur ouverture est régulée par de nombreux facteurs comme par exemple la lumière ou la teneur en CO_2 de l'atmosphère. Dans le cadre du PTI, la détection d'un PAMP par les cellules de garde du stomate entraîne sa fermeture (Melotto *et al.*, 2008 ; Figure 17). Au sein de ces cellules élicitées, les voies de signalisation classiques du PTI sont activées, ce qui aboutit à l'inhibition des mécanismes d'ouverture induits par les flux transmembranaires de potassium (Zeng *et al.*, 2010). En plus, ces mécanismes requièrent la présence de NO, de SA et également de l'acide abscissique (ABA) ainsi que les composants de leurs voies de signalisation. Le PTI médié par FLS2 limite la croissance des bactéries *P. syringae* lorsqu'elles sont pulvérisées à la surface de la feuille, mais n'a aucun effet restrictif sur leur croissance quand elles sont infiltrées dans la feuille (Zipfel *et al.*, 2004). Cette observation démontre l'importance de la fermeture stomatique lors des réponses de défense contre des bactéries phytopathogènes. D'autre part, à l'échelle de la plante entière, l'élicitation durable d'une plantule inhibe sa croissance *in vitro*, ce qui traduit une commutation du programme génétique de croissance vers celui de l'immunité (Boller et Felix 2009). Au niveau moléculaire, ce mécanisme est entre autres associé à une répression de l'expression des gènes de réponse à l'auxine. La SAR est également un mécanisme immunitaire qui touche la plante entière et qui s'étend dans le temps. C'est un mécanisme plus ou moins analogue à l'immunité adaptative des mammifères, et qui, suite à une infection, permet de diffuser un signal jusqu'aux tissus sains où le SA et les transcrits de protéines PR s'accumulent (Figure 18). Très récemment, deux études ont montré que NPR1 et ses paralogues sont les récepteurs du SA, établissant ainsi un lien direct entre le SA et l'activation des gènes de défense (Wu *et al.*, 2012 ; Fu *et al.*, 2012). La méthylation des histones semble

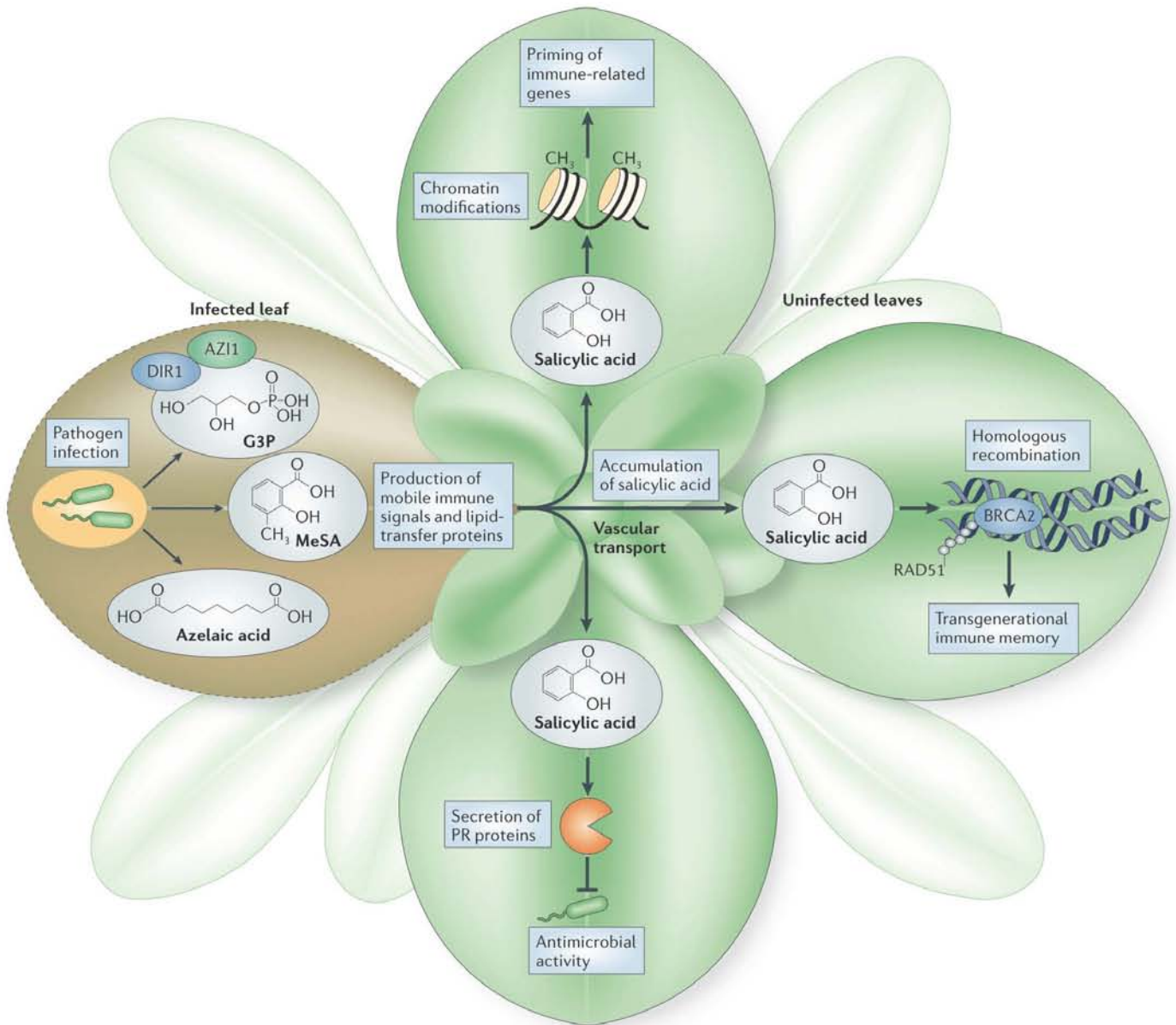


Figure 18. Réponse systémique acquise, mémoire transgénérationnelle et signaux associés

L'infection localisée de parasites induit l'accumulation de signaux mobiles comme l'acide azélaïque, les salicylates de méthyle et le glycérol-3-phosphate, ainsi que la lipid-transfer protein DIR1 (defective induced resistance 1) et la protéine AZI1 (azelaic acid induced 1). Les signaux mobiles vont être transportés de manière systémique par le système vasculaire dans les tissus non-infectés de la plante. Notamment, l'acide salicylique stimule l'expression de protéines PR et induit des modifications épigénétiques de l'ADN qui permettront de transmettre une mémoire immunitaire aux générations suivantes.

Spoel et Dong, Nature Reviews in Immunology, 2012

également avoir un rôle dans la SAR, permettant d'accélérer la réponse immunitaire en cas d'attaque par un parasite (Spoel et Dong 2012). La mémoire transgénérationnelle permet à une plante soumise à un PAMP ou à un agent pathogène de transmettre de manière épigénétique la résistance systémique acquise aux générations suivantes (Pieterse 2012). Ces modifications épigénétiques sont notamment liées à la méthylation de l'ADN et à des taux plus élevés de recombinaison homologue (Luna *et al.*, 2012 ; Molinier *et al.*, 2010). Pour finir, suite à des blessures causées par des herbivores, les plantes émettent des composés organiques volatils comme les terpènes ou l'éthylène, qui élicitent des réponses de défense chez les plantes environnantes (Baldwin *et al.*, 2006). L'implication exacte de ce mécanisme dans les réponses aux agents pathogènes microbiens reste à définir. Cependant, considérant que les insectes sont des vecteurs de microbes et que les blessures qu'ils engendrent constituent des voies d'accès privilégiées aux tissus végétaux, la pression parasitaire microbienne pourrait avoir contribué de manière importante dans l'établissement des mécanismes de signalisation par composés volatils.

2.3.7. Réponses de défense et contexte environnemental

Les plantes répondent non seulement aux parasites mais également aux conditions environnementales auxquelles elles sont soumises. Par exemple, l'expression des gènes de défense d'*Arabidopsis* fluctue selon un rythme circadien, et sont notamment induits à l'aube, probablement comme une anticipation des infections potentielles par des parasites qui dispersent leurs spores à cette période de la journée (Wang *et al.*, 2011). Dans ce sens, Bardhwaj et collaborateurs ont également montré qu'*Arabidopsis* est plus résistante à *P. syringae* pv. *tomato* après une période de croissance sans lumière (Bardhwaj *et al.*, 2011). D'autre part, les réponses de défense d'*Arabidopsis* sont dépendantes de la température (Alcazar et Parker 2011). En effet, les hautes températures abolissent quasi-systématiquement les phénotypes nains de mutants d'*Arabidopsis* au système immunitaire auto-actif. Plus généralement, les réponses aux contraintes biotiques et abiotiques semblent être partiellement superposables (Fujita *et al.*, 2006). Une telle interconnexion entre les différents processus de défense et le contexte environnemental ne doit pas être négligée lors des études d'interactions plantes-parasites, qui peuvent aisément se retrouver biaisées par la variabilité des facteurs environnementaux.

3. L'ETS : les effecteurs, facteurs de la compatibilité

La phase 2 du modèle en zigzag stipule que la sensibilité de l'hôte est déclenchée par des effecteurs apoplastiques et cytoplasmiques qui répriment les réponses de défense de type PTI et manipulent la structure et les fonctions de l'hôte. Le séquençage récent des premiers génomes de champignons et d'oomycète biotrophes a permis de mettre à jour d'importants répertoires de protéines sécrétées représentant des effecteurs potentiels, dont seule une poignée a réellement été caractérisée. La manière dont ces effecteurs permettent la virulence des parasites et les mécanismes assurant leur translocation à l'intérieur des cellules hôtes font actuellement l'objet d'intenses recherches.

3.1. Les effecteurs des biotrophes : définition et limites du concept

Le mode de vie biotrophe est partagé par les virus et certains champignons, oomycètes, bactéries, insectes, nématodes et plantes. A l'exception des plantes pour lesquelles aucun effecteur n'est connu à ce jour, l'ensemble des parasites biotrophes manipulent les tissus colonisés par le biais de molécules effectrices, généralement délivrées au sein des tissus par des structures spécialisées. De manière consensuelle, bon nombre d'auteurs définissent un effecteur comme une protéine sécrétée par un agent pathogène à l'intérieur de la cellule hôte et qui interfère avec les mécanismes du système immunitaire (Kemen et Jones 2012). Or, de nombreux contre-exemples dépassent cette définition, de même que certains effecteurs reconnus dans la littérature n'y correspondent pas (Encadré 2). Dans sa considération la plus globale, un effecteur est une molécule d'un organisme A qui altère de manière directe et spécifique la structure/fonction d'un organisme B. Cette définition, qui fait appel à la notion de phénotype étendu de Dawkins (Dawkins 1982), définit un effecteur comme une molécule opérationnelle dans un organisme différent de celui qui la code. En se basant sur une vision élargie des effecteurs, Schneider et Collmer ont récemment proposé une classification en cinq catégories des effecteurs impliqués dans les interactions plantes-parasites (Figure 19 ; Schneider et Collmer 2010). Ces catégories tiennent compte de la nature biochimique des effecteurs et des cibles, de leur localisation, de leurs rôles dans la promotion du PTI ou encore de leur capacité à promouvoir la virulence d'agents pathogènes biotrophes ou nécrotrophes. De multiples définitions du mot effecteur sont actuellement employées par différents auteurs (Martin et Kamoun 2012). La nécessité de trouver une définition universellement acceptée fait l'objet d'intenses discussions animant les réseaux sociaux sur Internet (<http://armchairbiology.blogspot.co.uk>).

Encadré 2. Grand bal des effecteurs : qui inviter?

Un effecteur est souvent présenté comme une protéine sécrétée par un agent pathogène à l'intérieur de la cellule hôte et qui interfère avec les mécanismes du système immunitaire, ou parfois comme une molécule microbienne qui altère la structure et les fonctions cellulaires de son hôte. Ces définitions sont, sur certains aspects, trop restrictives. Par exemple, les effecteurs TAL (transcription-activator like) favorisent la virulence d'un parasite sans perturber les mécanismes immunitaires, tandis que le bouleversement du phénotype qu'impose le champignon *Puccinia monoica* à son hôte et notamment l'induction d'organes (des pseudo-fleurs) est difficilement compatible avec une simple répression des mécanismes de défense. D'autre part, beaucoup d'effecteurs de champignons et d'oomycètes fonctionnent dans l'espace extracellulaire, tandis que la coronatine bactérienne, dont le rôle dans la virulence a été établi, est de nature non-protéique. Enfin, des microorganismes symbiotiques utilisent également des effecteurs, de même que les nématodes et les insectes utilisent des effecteurs. De fait, en suivant des définitions trop restrictives, on exclut certains effecteurs ce qui impose une vision trop simpliste de leur nature.

En outre, certaines protéines sécrétées des champignons *Cladosporium fulvum* ou *Magnaporthe oryzae* par exemple, bien qu'ayant un rôle clef dans la virulence et étant présentées comme des effecteurs par certains auteurs, ne remplissent pas tous les critères pour être des effecteurs dans la mesure où ces protéines séquestrent des composés fongiques et ne perturbent pas directement la structure/fonction des tissus de l'hôte. Cet exemple illustre combien les définitions abstraites, bien qu'utiles et nécessaires, sont limitées pour décrire de manière parfaitement appropriée des molécules impliquées dans les interactions plantes-microorganismes.

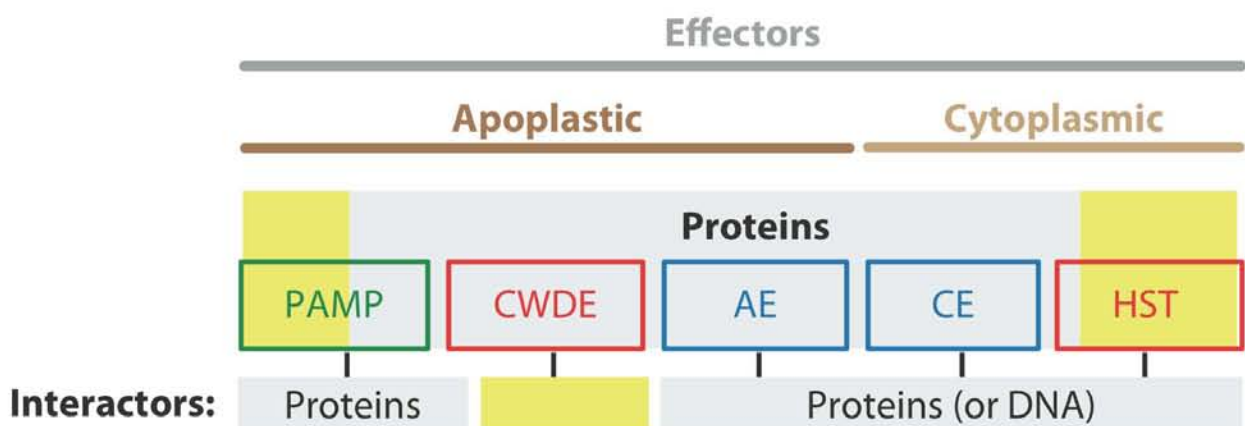


Figure 19. Les catégories d'effecteurs des microorganismes associés aux plantes

La couleur des boîtes indique si la fonction première de l'effecteur est d'induire le PTI (vert), de promouvoir la croissance des agents pathogènes biotrophes (bleu) ou nécrotrophes (rouge). Le gris indique (sauf mention) la nature protéique des effecteurs et de leurs cibles, tandis que le jaune indique les autres classes comme les peptidoglycanes, les polysaccharides ou encore les peptides non-ribosomiaux. CWDE : cell wall degrading enzyme, AE : apoplastic effector, CE : cytoplasmic effector, HST : host-selective toxin.

Schneider et Collmer, *Annual Reviews in Plant Biology*, 2010

3.2. Les facteurs de virulence bactériens

L'analyse quasi-exhaustive des effecteurs de la bactérie modèle Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 a révélé que ces derniers fonctionnent essentiellement en réprimant les réponses immunitaires d'arabidopsis par le biais de leurs interactions avec des cibles de virulence. D'autre part, l'étude des bactéries du genre Xanthomonas a permis de révéler l'existence des effecteurs TAL (transcription-activator like) qui ciblent l'ADN et favorisent la virulence des bactéries en régulant spécifiquement l'expression de certains gènes de l'hôte.

3.2.1. Les effecteurs de type III chez Pseudomonas et la suppression de l'immunité

La bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 sécrète via son système de sécrétion de type III une trentaine d'effecteurs à l'intérieur des cellules foliaires d'arabidopsis qui répriment les réponses de défense (Guo *et al.*, 2009). Ces effecteurs ciblent différents compartiments de la cellule, où ils interagissent avec des protéines impliquées essentiellement dans des fonctions liées aux mécanismes de défense (Deslandes et Rivas 2012 ; Block et al. 2011). Notamment, ces effecteurs ciblent les composants des voies de signalisation et de réponse du PTI, comme les domaines cytoplasmiques des PRR, les cascades MAPK, le trafic vésiculaire, ou encore la synthèse de l'acide salicylique dans le chloroplaste (Figure 20). Parmi les effecteurs de type III dont les fonctions biochimiques ont été décrites, on compte plusieurs inhibiteurs de kinases, des transférases de nucléotides phosphates, des ubiquitine ligases liées aux voies de dégradation dépendantes du protéasome, des protéases et des inhibiteurs de protéases (Tableau 3). Récemment, il a été montré que HopZ1 inhibe la biosynthèse des isoflavones pour permettre la virulence bactérienne, ce qui ajoute le métabolisme secondaire à la liste des fonctions ciblées par les effecteurs de *Pseudomonas* (Zhou *et al.*, 2011). Les manipulations génétiques de clusters d'effecteurs chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ont permis de mettre à jour des groupes d'effecteurs aux fonctions redondantes (REG ; redundant effector groups) ciblant différents niveaux du système immunitaire (Kvitko *et al.*, 2009 ; Schneider et Collmer 2010). D'autre part, ces approches ont également permis de montrer qu'un répertoire minimal de seulement huit effecteurs de type III est nécessaire à la croissance de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 chez le tabac (Cunnac *et al.*, 2011). Une analyse à grande échelle des cibles des effecteurs de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 chez arabidopsis a révélé que ces protéines ciblées sont

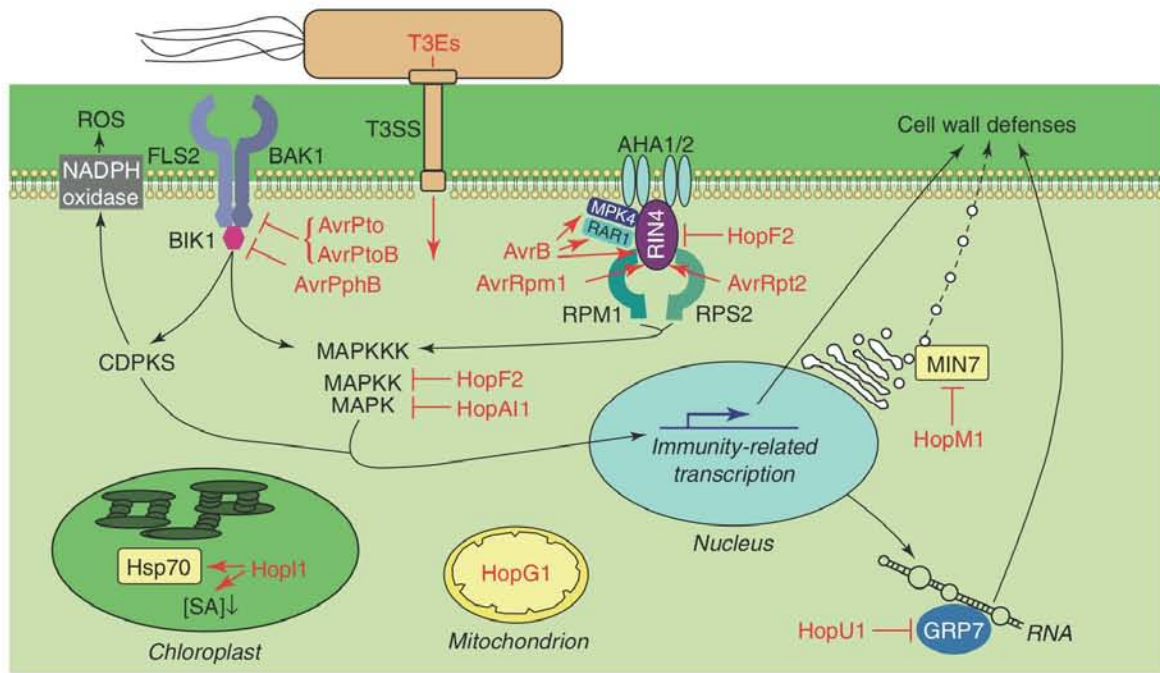


Figure 20. Fonctions ciblées par les effecteurs de *Pseudomonas syringae*

Les effecteurs de type III (T3E, type three effectors, en rouge) sont sécrétés par le système de sécrétion de type III (T3SS, type 3 secretion system) des bactéries à l'intérieur de la cellule hôte où ils ciblent des protéines (en noir) impliquées dans des fonctions telles que la reconnaissance des éliciteurs par les PRR, les cascades de phosphorylation MAPK, le complexe membranaire impliquant RIN4, les voies de sécrétion des vésicules ou encore le métabolisme des petits ARN, qui sont impliqués dans les mécanismes de défense. Ces fonctions sont ciblées dans le cytoplasme, les chloroplastes, les mitochondries, ou encore le noyau. *Block et Alfano, Current Opinion in Microbiology, 2011*

Tableau 3. Effecteurs bactériens avec fonctions et cibles connues

effector	Species	Activity	Target(s)
Pseudomonas			
AvrB	<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> race 0	Promotes phosphorylation	RIN4/RIPK/RAR1//MPK4
AvrRpm1	<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> race 0	Promotes phosphorylation	RIN4
HopI1	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ES4326	J-domain protein	Hsp70
AvrPphB	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> race 3	Cysteine protease	PBS1/BIK1/PBL1
HopZ1a	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> A2	Acetyltransferase	GmHID1/Tubulin
HopAI1	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 0288-9	Phosphothreonine lyase	MPK3/MPK4/MPK6/EDS1
AvrPtoB	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	E3 ubiquitin ligase	Fen/Pto/FLS2/BAK1/CERK1/RIN4
HopF2	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Mono-ADP-ribosyltransferase	RIN4/MKK5
HopN1	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Cysteine protease	PsbQ
HopU1	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Mono-ADP-ribosyltransferase	GRP7/GRP8
AvrPto	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> JL1065	Kinase inhibitor	Pto/FLS2/EFR/BAK1/RIN4
AvrRpt2	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> T1	Cysteine protease	RIN4
Xanthomonas			
XopD	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> B100	SUMO protease	AtMYB30
AvrAC	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8004	UMP transferase	RIPK/BIK1
AvrBs3	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> race 1	TAL	Upa20[Nodulin]/Bs3
PthXo1	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	TAL	Os8N3[sweet transporter]
AvrXa7	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	TAL	Os11N3[sweet transporter]
Ralstonia			
PopP2	<i>R. solanacearum</i> GM11000	Acetyltransferase	RRS1-R/RD19

Adapté de Deslandes et Rivas, *Trends in Plant Science*, 2012 / Boch et Bonas, *Annual Reviews in Phytopathology*, 2010

essentiellement des composants hyper-connectés de l'interatome de la plante (Mukthar *et al.*, 2011). Globalement, ces observations suggèrent qu'un nombre très restreint d'effecteurs permet de supprimer les réponses de défense des plantes, en ciblant des points névralgiques des fonctions cellulaires.

3.2.2. Les effecteurs TAL chez *Xanthomonas* et la régulation des gènes de l'hôte

Les genres bactériens *Xanthomonas* et *Ralstonia* possèdent des effecteurs appelés TAL, capables de se lier à l'ADN et d'induire l'expression de certains gènes de leurs hôtes de manière spécifique (Boch et Bonas 2010). Notamment, un code, faisant correspondre des acides aminés dans des domaines répétés des TAL à des nucléotides au sein de promoteurs, spécifie précisément la manière dont l'effecteur va pouvoir épouser la structure tridimensionnelle de l'ADN pour s'y attacher (Boch *et al.*, 2009 ; Moscou et Bogdanove 2009 ; Mak *et al.*, 2012 ; Deng *et al.*, 2012). Plusieurs effecteurs TAL induisent l'expression de gènes de susceptibilité codant des transporteurs de sucres nécessaires à la croissance des bactéries (Yang *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2010 ; **Figure 21**). D'autres effecteurs TAL induisent l'expression de facteurs de transcription qui stimulent l'expansion des cellules, ce qui favorise vraisemblablement la dispersion des bactéries (Kay *et al.*, 2007 ; Saijo et Schulze-Lefert 2008). Les bactéries *Xanthomonas* spp. n'utilisent pas que les effecteurs TAL pour assurer leur virulence. A la manière des bactéries *Pseudomonas* spp., des effecteurs de type III suppriment les réponses de défense en inhibant par exemple des cascades MAPK (Feng *et al.*, 2012). Ces observations supportent l'idée que la suppression des réponses de défense est une condition nécessaire mais pas suffisante pour établir la compatibilité, et que ces bactéries doivent davantage manipuler les fonctions de l'hôte pour assurer leur virulence. Les effecteurs TAL font actuellement l'objet d'intenses recherches en biotechnologie. En effet, leur capacité à lier spécifiquement l'ADN pour en réguler la transcription ouvre des perspectives de manipulation ciblée ou d'édition des génomes via des effecteurs fusionnés à des nucléases (Boch 2011 ; Li *et al.*, 2012).

3.3. Les effecteurs des oomycètes

Le séquençage des génomes d'oomycètes a permis d'établir rapidement des répertoires d'effecteurs candidats qui ont été caractérisés par des approches à haut-débit. En parallèle, une poignée de facteurs de virulence cytoplasmiques et apoplastiques ont été caractérisés.

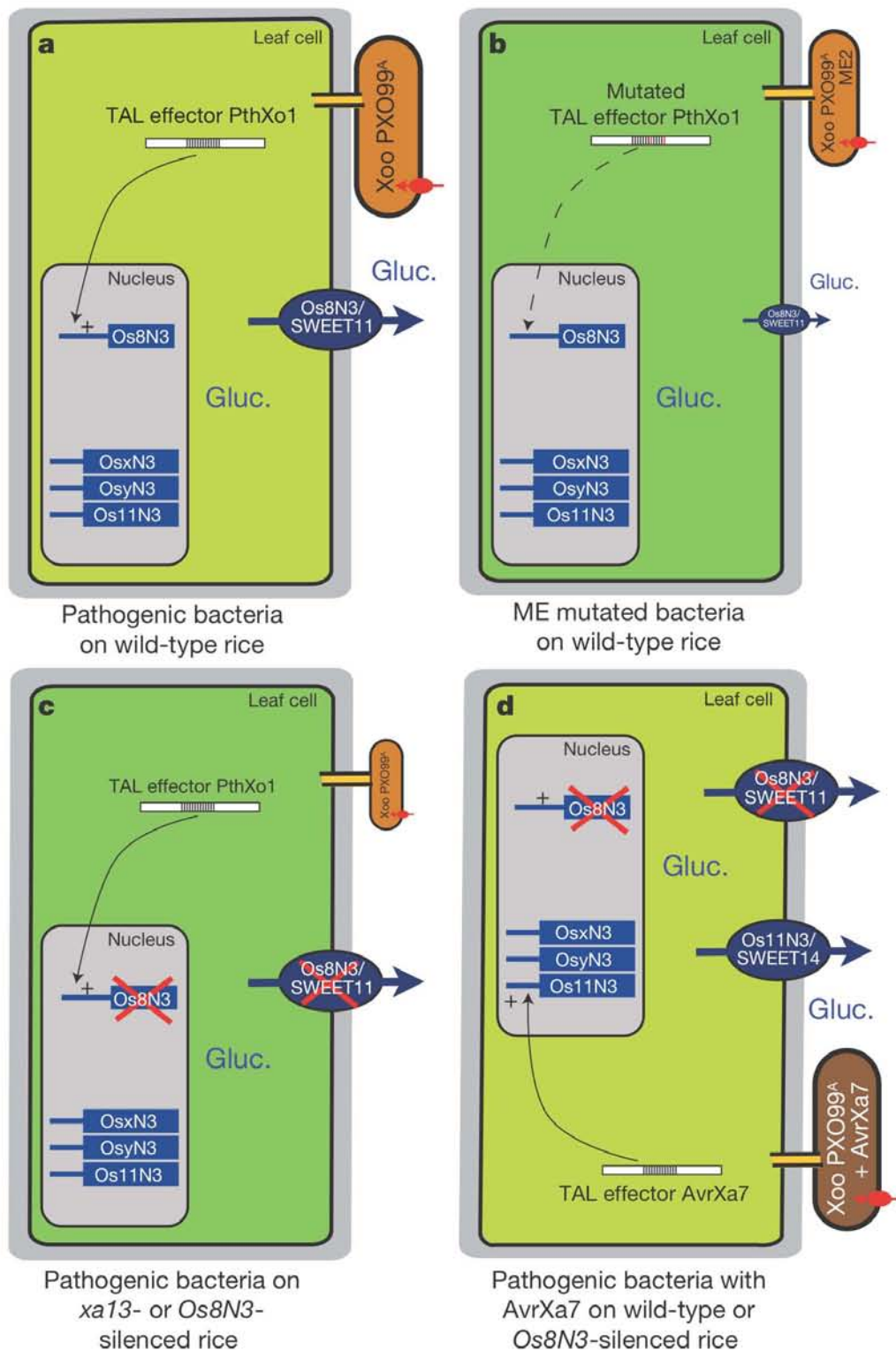


Figure 21. Les effecteurs TAL, la régulation du transport de sucre et la virulence des bactéries

(a) L'effecteur TAL PthXo1 de la souche PXO99^A de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) induit l'expression du transporteur de sucre Os8N3, menant à une forte virulence des bactéries. (b-c) L'effecteur muté (b) ou la mutation du promoteur d'Os8N3 (c) entraîne l'absence d'induction du gène et un phénotype de virulence diminué. (d) La perte de fonction de PthXo1 peut être compensée par la présence de l'effecteur TAL AvrXa7 qui induit l'expression d'un autre transporteur de sucre, Os11N3, ce qui restaure la virulence des bactéries.

Chen et al., *Nature*, 2010

3.3.1 Les répertoires d'effecteurs candidats avec des motifs conservés

Les recherches menées sur *P. infestans*, *Phytophthora sojae*, *Hyaloperonospora arabidopsidis* ou encore *Albugo laibachii* se sont accélérées suite au séquençage de leur génome et l'identification chez leurs effecteurs cytoplasmiques de motifs en acides aminés conservés de type RXLR, LXLFLAK ou CHXC impliqués dans la translocation des protéines à l'intérieur des cellules hôtes (Haas *et al.*, 2009 ; Tyler *et al.*, 2006 ; Baxter *et al.*, 2010 ; Kemen *et al.*, 2011 ; Whisson *et al.*, 2007 ; Figure 22). Grâce à ces motifs, des répertoires d'effecteurs candidats contenant plusieurs centaines de membres ont pu être dressés rapidement (Raffaele *et al.*, 2010). Des cribles transcriptomiques ont révélé l'induction spécifique de certains effecteurs candidats et permis d'établir des répertoires plus restreints dont les membres sont probablement impliqués dans la virulence des parasites (Haas *et al.*, 2009). Ces répertoires ont été à leur tour criblés *in planta* par des approches dites d'effectoromique pour leur fonction de virulence (ou plus globalement leur capacité à conférer un phénotype) et leur localisation sub-cellulaire (Oh *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2011 ; Fabro *et al.*, 2011 ; Schornack *et al.*, 2010 ; Caillaud *et al.*, 2012). Ces approches ont révélé des effecteurs candidats avec des fonctions de virulence, parfois même chez des plantes non-hôtes. De même, beaucoup de protéines ont été localisées au niveau des noyaux ou des membranes. Comme chez les bactéries, les effecteurs eucaryotes semblent donc cibler différents compartiments cellulaires pour promouvoir la croissance parasitique.

3.3.2. Les facteurs de virulence d'oomycètes

L'analyse détaillée de quelques effecteurs cytoplasmiques de *P. infestans* et *P. sojae* a permis de mettre en évidence les mécanismes par lesquels ils favorisent la virulence. Des effecteurs de la famille Avr3a de *Phytophthora* spp. interagissent avec une ubiquitine ligase pour la stabiliser et réprimer les réponses immunitaires, d'une manière dépendante de leur capacité à lier les phospholipides (Bos *et al.*, 2010, Yaeno *et al.*, 2011). D'autre part, Avrblb2 inhibe la sécrétion focalisée de la cystéine protéase C14 dans les cellules de tabac accommodant un haustorium, ce qui augmente la susceptibilité des plantes aux infections (Bozkurt *et al.*, 2011). Très récemment, CRN8 chez *P. infestans* a été décrit comme le premier effecteur kinase identifié chez un parasite des plantes (Van Damme *et al.*, 2012a). CRN8 est localisé au niveau du noyau des cellules végétales et participe à la virulence de *P. infestans* quand il est exprimé *in planta*. Avr3b de *P. sojae* est une Nudix hydrolase qui augmente la virulence des oomycètes quand elle est

Chapitre I

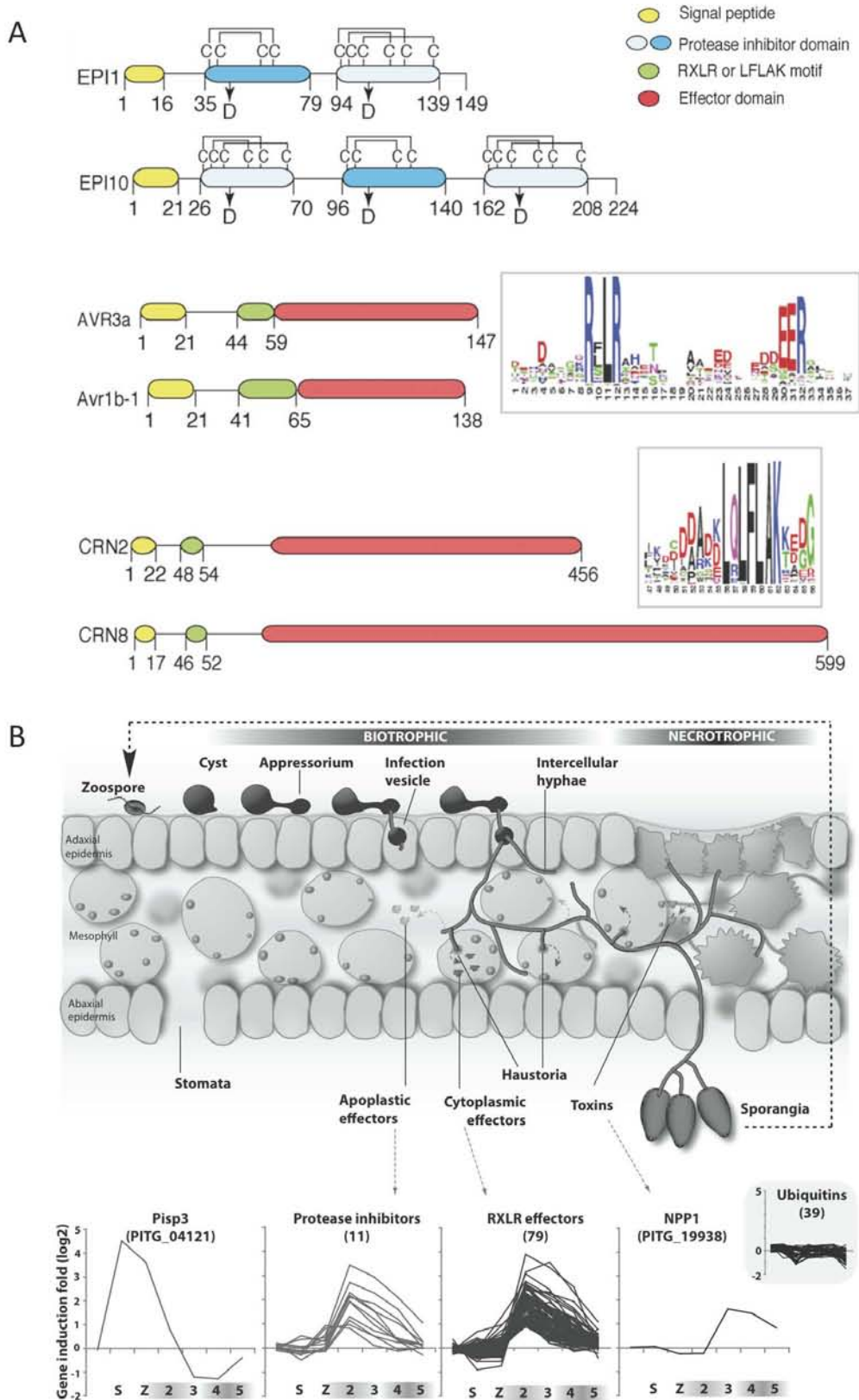


Figure 22. Les effecteurs de *Phytophthora infestans* : motifs de translocation conservés et expression

(A) Membres représentatifs des familles d'effecteurs apoplastiques, riches en cystéines (EPI1) et cytoplasmiques, aux domaines RXLR (Avr3a et avr1b-1) et LXLFLAK (CRN2 et 8) conservés. (B) Cycle hémibiotrophe de *P. infestans* et profils d'expression des transcrits de différentes classes d'effecteurs candidats associés aux différents stades infectieux. S : sporange, Z : zoospore ; 2, 3, 4 et 5 réfèrent au nombre de jours après inoculation sur feuilles de pomme de terre.

Adapté de Kamoun, *Current Opinion in Plant Biology*, 2007 / Van Damme et al., 'Effectors in plant-microbes interactions', 2012

exprimée chez le tabac, probablement en réduisant l'accumulation de ROS au niveau des sites d'infection (Dong *et al.*, 2011). Chez *H. arabidopsidis*, les effecteurs HaRxL17, ATR1 ou ATR13 confèrent également une sensibilité accrue aux agents pathogènes chez les plantes où ils sont exprimés, par des mécanismes qui restent encore inconnus (Sohn *et al.*, 2007 ; Caillaud *et al.*, 2012). Concernant les effecteurs apoplastiques, quelques dizaines de gènes codant des enzymes de dégradation, des protéases et des inhibiteurs de protéases ont été identifiés au sein des génomes d'oomycètes (Van Damme *et al.*, 2012b). Par exemple, EPIC1 et EPIC2B de *P. infestans* sont des protéines riches en cystéines qui inhibent les cystéine protéases Rcr3 et C14, ce dernier étant un régulateur positif des réponses de défense chez la tomate (Wulff *et al.*, 2009 ; Kashani *et al.*, 2010). De manière intéressante, C14 est ciblée à la fois par un effecteur cytoplasmique (Avrblb2) dans la cellule hôte et par des effecteurs apoplastiques dans l'espace extracellulaire. Cela révèle que pour promouvoir leur virulence, les oomycètes ont développé au cours de leur évolution plusieurs effecteurs pouvant interférer avec un même composant des défenses végétales au niveau de différents compartiments (Bozkurt *et al.*, 2012).

3.4. Les effecteurs des champignons

A l'instar des oomycètes, la disponibilité de plusieurs génomes de champignons a permis d'établir des catalogues d'effecteurs candidats, bien que l'absence de motifs conservés ait rendu la tâche plus complexe. En particulier, l'étude de l'expression de ces répertoires in planta a permis de révéler des vagues d'expression d'effecteurs candidats en fonction du stade d'infection. Quelques facteurs de virulence cytoplasmiques et apoplastiques ont été décrits à ce jour.

3.4.1. Les répertoires d'effecteurs candidats fongiques : les petites protéines sécrétées

Les génomes d'une vingtaine d'espèces de champignons pathogènes de plantes (majoritairement des ascomycètes) ont été séquencés et analysés ces dernières années (Figure 23 ; Raffaele et Kamoun 2012). Il convient d'ajouter à cette liste *Laccaria bicolor* et *Tuber melanosporum* qui, bien que symbiotes mutualistes, restent néanmoins des microorganismes au mode de vie biotrophe (Martin *et al.*, 2008, 2010 ; Kemen *et al.*, 2012). Au total, les génomes de sept basidiomycètes, tous biotrophes, ont été séquencés à ce jour. Les agents du charbon du maïs, *U. maydis* et *Sporisorium reilianum*, l'agent du charbon de l'orge *Ustilago hordei* ainsi que *L. bicolor* sont des biotrophes non-

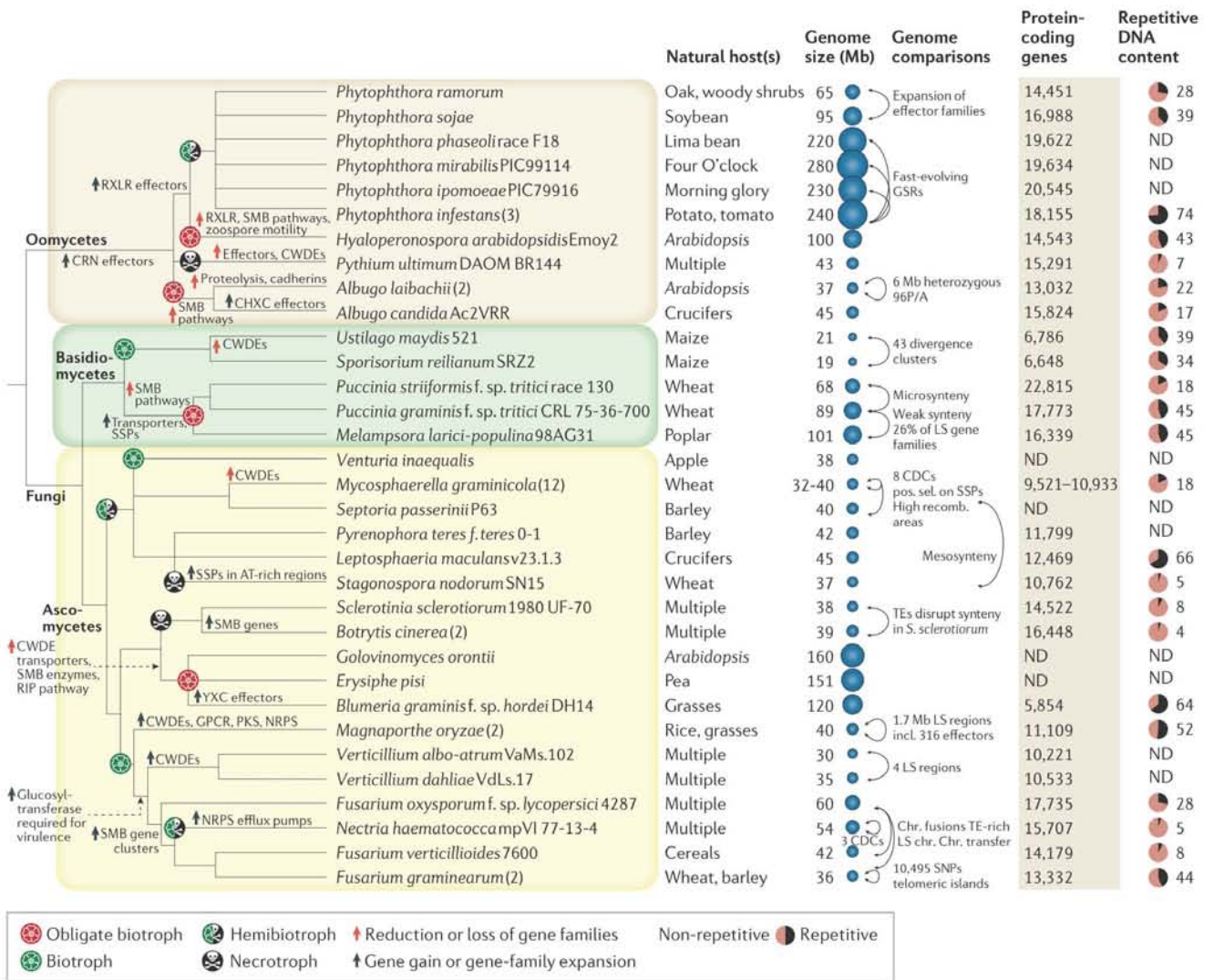


Figure 23. Les génomes séquencés de champignons et d'oomycètes parasites des plantes

Les relations phylogénétiques, le mode de vie ainsi que les familles de gènes ayant subi d'importantes variations au cours de l'évolution sont présentés pour la trentaine d'agents pathogènes filamenteux des plantes dont le génome a été séquencé, analysé et publié. L'hôte naturel, la taille du génome, le nombre de gènes codants des protéines et la proportion d'éléments répétés au sein des génomes sont également précisés.

Raffaele et Kamoun, Nature Reviews in Microbiology, 2012

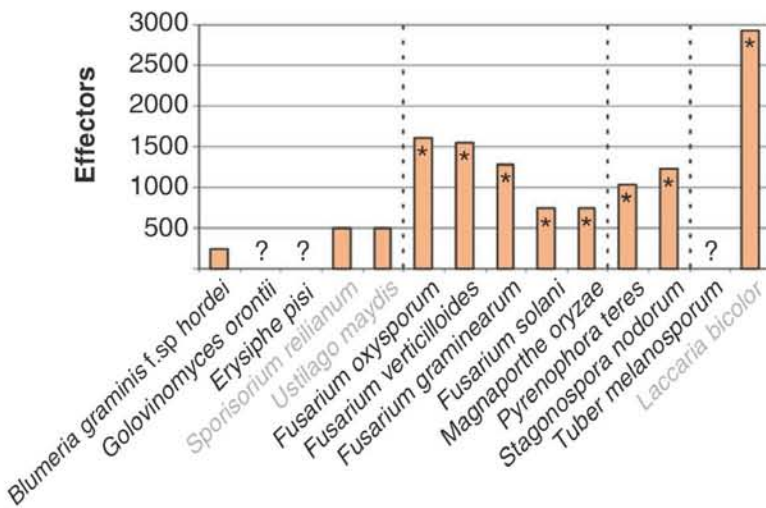


Figure 24. Les répertoires d'effecteurs candidats établis chez les champignons

Les barres indiquent le nombre d'effecteurs candidats identifiés au sein du génome, ou bien le nombre total de protéines sécrétées si marqué d'un astérisque. Le point d'interrogation indique que l'information n'est pas disponible.

Schmidt et Panstruga, Current Opinion in Plant Biology, 2011

obligatoires (ou non-stricts) tandis que les agents des rouilles *P. graminis* f. sp. *tritici*, *P. striiformis* f. sp. *tritici* et *M. larici-populina* sont des biotrophes obligatoires (Kamper *et al.*, 2006 ; Schirawski *et al.*, 2010 ; Laurie *et al.*, 2012 ; Duplessis *et al.*, 2011 ; Cantu *et al.*, 2011). Comme pour les oomycètes, plusieurs groupes de chercheurs ont entrepris d'établir des catalogues d'effecteurs candidats chez ces champignons, mais contrairement aux oomycètes, les effecteurs fongiques ne présentent pas de domaines conservés connus parmi les effecteurs décrits jusqu'à ce jour, ce qui rend difficile l'identification de nouveaux effecteurs candidats sur cette base (Rafiqi *et al.*, 2012). Néanmoins, en se basant sur certains critères énumérés ci-dessous, des répertoires d'effecteurs candidats ont été dressés (Schmidt et Panstruga 2011 ; Figure 24). Les effecteurs fongiques sont en général de petites protéines sécrétées, riches en cystéines et qui présentent des signatures d'évolution accélérée (pression de sélection positive) (Stergiopoulos et De Wit 2009). De plus, ils sont la plupart du temps spécifiques à une espèce ou à un genre donné, ce qui complique leur identification par recherche d'homologies de séquence. Des motifs conservés de type Y/F/WxC ont été identifiés dans la partie N-terminale d'effecteurs candidats de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* et de *M. larici-populina* (Godfrey *et al.*, 2010 ; Duplessis *et al.*, 2011). S'il s'avère que ces motifs ont un rôle quelconque durant l'infection, cela ouvrirait des perspectives pour cribler plus rapidement les génomes fongiques à la recherche d'effecteurs candidats.

3.4.2. L'expression dynamique des effecteurs candidats in planta

L'analyse de l'expression transcriptionnelle des répertoires d'effecteurs candidats a permis de révéler leur forte induction *in planta*, qui peut être spécifique aux stades et structures d'infection, voire même à certains organes de plante infectés. En effet, le répertoire d'effecteurs candidats de *B. graminis* ou encore les effecteurs de *M. lini* sont induits au sein des hautoria (Spanu *et al.*, 2010 ; Catanzariti *et al.*, 2006). L'étude dynamique des transcriptomes de *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum higginsianum* ou encore *M. larici-populina* infectant leurs hôtes a révélé des effecteurs candidats induits par vagues successives au cours de l'infection, suggérant des fonctions spécifiquement associées à ces phases et aux structure fongiques alors formées (Lysoe *et al.*, 2011 ; Kleemann *et al.*, 2012 ; Duplessis *et al.*, 2011). En accord avec ces observations, l'analyse du transcriptome d'*U. maydis* infectant différents organes du maïs a montré que des groupes spécifiques d'effecteurs candidats sont exprimés dans des organes différents (Skibbe *et al.*, 2010). Aux stades tardifs de l'infection de feuilles

de peupliers par *M. larici-populina*, la microdissection laser suivie de l'analyse comparée de l'expression des transcrits ont révélé une expression spécifique au sein de certaines structures fongiques, les effecteurs candidats étant majoritairement exprimés dans les tissus biotrophes par rapport aux tissus sporifères (Hacquard *et al.*, 2010). D'une manière générale, ces études suggèrent que le déploiement de jeux d'effecteurs est régulé dans l'espace et dans le temps. Ces études transcriptomiques ont permis d'affiner les catalogues d'effecteurs candidats pour les analyses fonctionnelles subséquentes. En outre, l'analyse des transcriptomes a aussi permis d'appréhender les fonctions clés mises en jeu de manière dynamique lors des différentes étapes de la croissance biotrophe. Par exemple, le métabolisme primaire de *B. graminis* est hautement régulé au cours d'une infection, tandis que la mobilisation du métabolisme des lipides, de la synthèse de mélanine et de l'autophagie est associée avec la formation des appressoria chez *M. oryzae* (Both *et al.*, 2005 ; Soanes *et al.*, 2012). Enfin, l'expression de nombreux transporteurs de *M. larici-populina* est induite aux temps tardifs d'infection, ce qui permettrait d'augmenter le détournement et le transport massif de nutriments nécessaires à la biogenèse des tissus sporifères (Duplessis *et al.*, 2011).

3.4.3. Les facteurs de virulence/compatibilité

Quelques dizaines d'effecteurs fongiques ont été décrits jusqu'alors (Tableau 4). La majorité d'entre eux n'ont pas d'activité biochimique connue, et leur localisation ainsi que leur contribution dans la virulence du champignon restent à démontrer (Stergiopoulos et De Wit 2009). Néanmoins, une poignée de facteurs de virulence a été décrite. Parmi les premiers furent AVR_{a10} et AVR_{K1} de *B. graminis*, qui favorisent l'infection des cellules dans lesquels ils sont exprimés (Ridout *et al.*, 2006). La protéine Avr2 de *C. fulvum* inhibe des cystéine protéases de plantes et confère une virulence accrue à de nombreux champignons pathogènes quand elle est exprimée chez arabidopsis (Van Esse *et al.*, 2008). Avr1 (anciennement Six 4) de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* supprime des réponses de défense de type ETI déclenchées par d'autres effecteurs, restaurant ainsi la virulence du champignon chez la tomate (Takken et Rep 2010). D'une manière similaire, certains effecteurs de *C. higginsianum* suppriment la HR et augmentent la croissance de bactéries pathogènes quand ils sont exprimés chez arabidopsis, par des mécanismes qui restent inconnus (Kleemann *et al.*, 2012). Plusieurs facteurs de virulence ont été récemment identifiés chez *U. maydis* (Doehlemann *et al.*, 2012). Pep1 est une petite protéine sécrétée qui inhibe l'activité d'une peroxydase

Tableau 4. Les effecteurs de champignons

effector ^a	effector size ^b	Cys ^c	SP ^d	positive selection	localization in plant ^e	function/homology	required for virulence	R gene (protein type)
Magnaporthe oryzae (rice)								
Ace1	4035	43	no	-	-	polyketide synthase	-	Pi33
Avr-Pita	176	8	yes	yes	cytoplasm	Metalloprotease-like	no	Pi-ta (NB-LRR)
Avr-Pita2	-	8	yes	yes	apoplast	Metalloprotease-like	no	Pi-ta (NB-LRR)
Avr-Pita3	-	8	yes	yes	cytoplasm	Metalloprotease-like	no	-
Pwl1	124	2	yes	-	apoplast	-	-	-
Pwl2	126	1	yes	-	apoplast	-	-	-
Pwl3	116	0	yes	-	apoplast	-	-	-
Pwl4	117	0	yes	-	apoplast	-	-	-
Avr1-CO39	-	-	-	yes	-	-	-	Pi-CO39
AvrPiz-t	108	-	yes	-	-	suppress cell death	-	Piz-t (NB-LRR)
Avr-Pia	85	2	yes	-	cytoplasm	-	-	Pia (NB-LRR)
Avr-Pii	70	3	yes	-	cytoplasm	-	-	Pii (NB-LRR)
Avr-Pik/km/kp	113	3	yes	-	cytoplasm	-	-	Pi-k/pi-Km/Pi-kp (NB-LRR)
MC69	54	2	yes	-	apoplast	-	yes	-
Slp1	135	6	yes	-	apoplast	bind chitin	yes	-
Cladosporium fulvum (tomato)								
Avr2	58	8	yes	yes	apoplast	Protease inhibitor	yes	Cf-2 (LRR-RLP)
Avr4	86	8	yes	yes	apoplast	Chitin-binding	yes	Cf-4 (LRR-RLP)
Avr4E	101	6	yes	yes	apoplast	-	-	Hcr9-4E (LRR-RLP)
Avr9	28	6	yes	yes	apoplast	Carboxypeptidase inhibitor	-	Cf-9 (LRR-RLP)
Ecp1	65	8	yes	No	apoplast	Tumor-necrosis factor receptor	yes	Cf-Ecp1
Ecp2	143	4	yes	No	apoplast	-	yes	Cf-Ecp2
Ecp4	101	6	yes	No	apoplast	-	-	Cf-Ecp4
Ecp5	98	6	yes	No	apoplast	-	-	Cf-Ecp5
Ecp6	199	8	yes	No	apoplast	LysM-domains; chitin-binding	yes	-
Ecp7	100	6	-	-	apoplast	-	-	-
Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (tomato)								
Avr3 (Six1)	189	8	yes	-	Xylem	-	yes	I-3
Six2	172	8	yes	-	Xylem	-	no	-
Six3	144	2	yes	-	Xylem	-	yes	I-2 (NB-LRR)
Avr1 (Six4)	184	6	yes	-	Xylem	suppress ETI	(yes)	I or I-1
Melampsora lini (flax)								
AvrL567	127	1	yes	yes	cytoplasm	-	no	L5, L6 and L7 (NB-LRR)
AvrM	314	1	yes	yes	cytoplasm	-	-	M (NB-LRR)
AvrP123	94	11	yes	yes	cytoplasm	Kazal Ser protease inhibitor	-	P, P1, P2 and/or P3 (NB-LRR)
AvrP4	67	6	yes	yes	cytoplasm	Cystine knotted peptide	-	P4 (NB-LRR)
Ustilago maydis (maize)								
cmu1	265	-	yes	-	cytoplasm	chorismate mutase	yes	-
pit1	435	-	-	-	-	-	-	-
pit2	118	-	yes	-	-	-	-	-
Pep1	178	4	yes	-	apoplast	peroxidase inhibitor	yes	-
Leptosphaeria maculans (oilseed rape)								
AvrLm1	183	1	yes	yes	cytoplasm	-	-	Rlm1
AvrLm6	124	6	yes	-	apoplast	-	-	Rlm6
AvrLm4-7	122	8	yes	yes	apoplast	-	-	Rlm4 and/or Rlm7
Rhynchosporium secalis (barley)								
Nip1	60	10	yes	yes	apoplast	induces necrosis	no	Rrs-1
Nip2	-	6	yes	yes	apoplast	induces necrosis	no	-
Nip3	-	8	yes	yes	apoplast	induces necrosis	no	-
Blumeria graminis f. sp. hordei (barley)								
Avra10	286	4	-	-	cytoplasm	-	-	Mla10 (NB-LRR)
Avrk1	177	3	-	-	cytoplasm	-	-	Mlk1 (NB-LRR)
Colletotrichum orbiculare (cucumber)								
NIS1	142	0	yes	-	apoplast	-	no	-
DN3	74	0	yes	-	apoplast	suppress cell death	-	-
Puccinia graminis f. sp. tritici (barley)								
RGD-binding protein	820	7	no	-	apoplast	induce HR	-	Rpg1 (RLK)
VPS9	744	4	no	-	apoplast	induce HR	-	Rpg1 (RLK)
Laccaria bicolor (tree roots)								
MiSSP7	68	0	yes	no	cytoplasm	-	yes	-
Glomus intraradices (plant roots)								
SP7	248	0	yes	-	cytoplasm	limit immune responses	yes	-

^aLes protéines discutées dans l'encadré 2 ainsi que celles codant des métabolites secondaires sont indiquées

^btaille de l'effecteur mature

^cnombre de cystéines

^dprédiction d'un signal peptide de sécrétion

^ecertaines localisations proviennent d'évidences indirectes

Adapté de Stergiopoulos et De Wit, Annual Reviews in Plant Science, 2009 / Khang et Valent, Current Opinion in Plant Biology, 2010 / Djamei et al., Nature, 2011 / Doehlemann et al., PLoS Pathogens, 2009 / Doehlemann et al., Molecular microbiology, 2011 / Hemetsberger et al., PLoS Pathogens, 2012 / Yoshino et al., 2012 / Mentlak et al., The Plant Cell, 2012 / Saitoh et al., PLoS Pathogens, 2012.

apoplastique de plante, et ainsi permet la virulence du champignon sur le maïs (Doehlemann *et al.*, 2009 ; Hemetsberger *et al.*, 2012). La chorismate mutase *cmu1* d'*U. maydis* est sécrétée dans le cytoplasme et réoriente le métabolisme secondaire du maïs en perturbant la synthèse d'acide salicylique et de phénylpropanoïdes, ce qui permet la virulence du champignon (Djamei *et al.*, 2011 ; Figure 25). Cette étude constitue une des premières preuves, avec l'étude récente des effecteurs bactériens HopZ1 et de la coronatine, de l'importance des perturbations métaboliques pour la virulence des parasites (Zhou *et al.*, 2011 ; Zheng *et al.*, 2012). Toujours chez *U. maydis*, les gènes *pit* sont importants pour la formation des tumeurs chez le maïs, bien que leur mécanisme d'action reste indéterminé. Enfin, l'étude de nombreux mutants de délétion a révélé plusieurs clusters de gènes codant des facteurs de virulence qu'il reste maintenant à caractériser (Doehlemann *et al.*, 2012). Par des approches génétiques, l'effecteur MC69 a été décrit comme nécessaire à la virulence complète de *M. oryzae* sur le riz (Saitoh *et al.*, 2011). Ces approches de délétion génétique menées chez *U. maydis* et chez *M. oryzae* donnent rarement des phénotypes de virulence diminués, ce qui souligne probablement une forte redondance fonctionnelle des facteurs de virulence chez ces champignons. MiSSP7 et SP7, des effecteurs des champignons symbiotiques *L. bicolor* et *G. intraradices*, sont nécessaires pour la formation de mycorhizes avec leurs hôtes (Plett *et al.*, 2011 ; Klopffholz *et al.*, 2011). Ces deux effecteurs perturbent l'expression des gènes au niveau des racines et ils sont localisés dans les noyaux de l'hôte, où SP7 interagit notamment avec un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme de l'éthylène. Dans la mesure où ces microorganismes ne sont pas des agents pathogènes, le terme de facteur de compatibilité convient mieux que celui de facteur de virulence. Les protéines sécrétées Ecp6 de *C. fulvum* et Slp1 de *M. oryzae* jouent un rôle dans la virulence en séquestrant des PAMP, ce qui inhibe donc indirectement la mise en place de réponses de défense et favorise la croissance parasitique (De Jonge *et al.*, 2009 ; De Jonge et Thomma 2009 ; Mentlak *et al.*, 2012). Les auteurs ont qualifié ces protéines d'effecteurs ayant des fonctions de virulence, bien qu'ils ne correspondent pas *sensu stricto* aux critères requis pour être qualifiés de telle sorte (Encadré 2). Chez *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, les gènes codant des effecteurs sont portés par des sections entières du génome nommées les « chromosomes mobiles de pathogénicité ». Le transfert de ces chromosomes dans l'espèce *F. verticillioides* non-pathogène rend cette

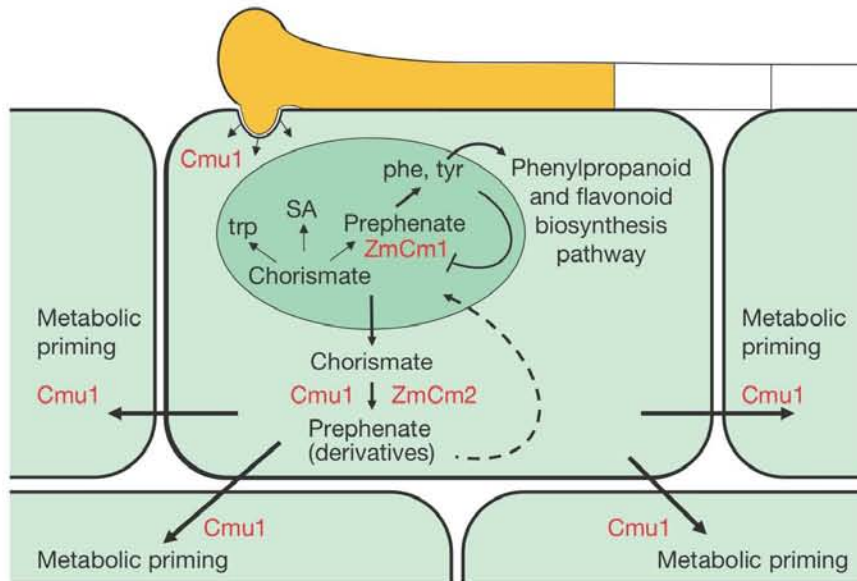


Figure 25. Mode de fonctionnement de Cmu1 d'*Ustilago maydis*

La chorismate mutase Cmu1 est sécrétée dans le cytoplasme d'une cellule de maïs (vert pâle) infectée par *Ustilago maydis* (en jaune orangé), puis diffuse dans les cellules voisines. Cette enzyme favorise la virulence du champignon en aiguillant le chorismate vers la voie des phénylpropanoïdes au détriment de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique (SA). Les flèches indiquent le mouvement de Cmu1 ou des transitions métaboliques, la flèche en pointillé indique un mouvement physique ou un rétro-contrôle du préphanate ou de ses dérivés sur certains processus du chloroplaste (en vert foncé). ZmCmu1 et ZmCmu2 indiquent les chorismate mutases de la plante.

Djamei et al., Nature, 2011

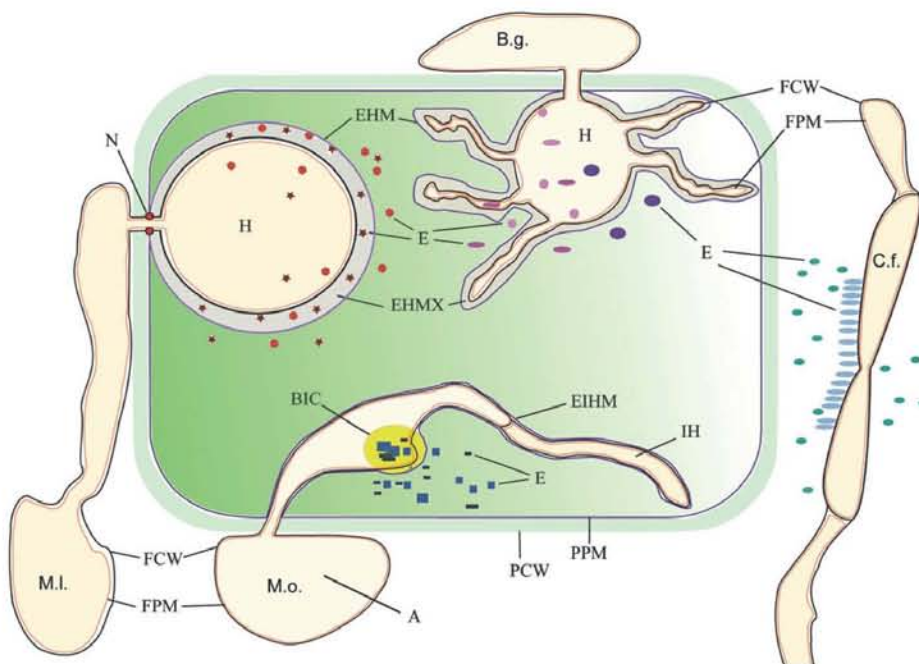


Figure 26. Les structures de sécrétion des effecteurs des champignons biotrophes

Principales structures d'infection des champignons parasites biotrophes des plantes. *Cladosporium fulvum* (C.f.) envahit l'apoplaste, *Magnaporthe oryzae* (M.o.) différencie des hyphes invasives (IH) et une interface biotrophe appelée BIC (biotrophic interfacial complex, en jaune) dans la cellule hôte, *Melampsora lini* (M.l.) et *Blumeria graminis* (B.g.) invaginent des haustoria (H) simples ou ramifiés dans la cellule hôte. Les formes colorées symbolisent les effecteurs (E) sécrétés dans l'apoplaste, dans le cytoplasme ou dans la matrice extra-haustoriale (EHMX) par les différents parasites. FPM: membrane plasmique fongique, FCW: paroi cellulaire fongique, A: appressorium, N (en rouge): cou de l'haustorium, EHM: membrane extrahaustoriale, PCW: Paroi cellulaire végétale, PPM: membrane plasmique végétale, EIHM: membrane de l'hyphes invasif

Koeck et al., Cellular microbiology, 2011

dernière pathogène, ce qui démontre leur implication dans la virulence fongique (Ma *et al.*, 2010).

3.5. Sécrétion, entrée et diffusion des effecteurs eucaryotes dans les cellules hôtes

Les bactéries, les insectes et les nématodes possèdent des structures leur permettant de perforer les cellules hôtes pour y sécréter directement leurs effecteurs. Au contraire, les oomycètes et les champignons respectent l'intégrité des cellules infectées et sécrètent des effecteurs dans une interface hôte-parasite, à partir de laquelle les effecteurs cytoplasmiques entrent dans les cellules hôtes. Très peu de démonstrations directes de cette translocation dans une cellule hôte à partir d'un champignon ont été faites et les mécanismes d'internalisation proposés restent discutés. Certains effecteurs sont également capables de diffuser dans les tissus, de cellules en cellules, accroissant le rayon d'action des parasites au-delà des cellules infectées.

3.5.1. Les systèmes de sécrétion directe

Les bactéries utilisent des systèmes de sécrétion qui ressemblent à des seringues moléculaires pour transpercer la membrane plasmique et délivrer leurs effecteurs directement dans le cytoplasme (Cornelis 2006). De même, insectes et nématodes utilisent des stylets pour sécréter des molécules dans les tissus vasculaires ou dans les cellules (Hogenhout et Bos 2011 ; Gheysen et Mitchum 2011). Ainsi, les effecteurs de ces parasites sont transférés directement depuis le parasite vers la cellule hôte.

3.5.2. Structures de sécrétion des effecteurs fongiques

Les champignons sécrètent des effecteurs via leurs spores, leurs hyphes d'infection, leurs haustoria ainsi que via leurs appressoria (Nirmala *et al.*, 2011 ; Rafiqi *et al.*, 2012 ; Kleemann *et al.*, 2012). D'une manière générale, chez les champignons formant des haustoria, on associe ces structures à la sécrétion des effecteurs cytoplasmiques, tandis que les effecteurs apoplastiques sont sécrétés par les hyphes d'infection, bien qu'il ne soit pas exclu que des effecteurs sécrétés via des haustoria puissent résider dans l'espace péri-haustorial (Figure 26 ; Dodds *et al.*, 2009 ; Koeck *et al.*, 2011). Chez *M. lini*, les transcrits codant les quatre effecteurs connus s'accumulent fortement dans les haustoria (Catanzariti *et al.*, 2006). Ces facteurs d'avirulence sont reconnus par des protéines NB-LRR cytoplasmiques, ce qui suggère que ces quatre effecteurs entrent dans les cellules de l'hôte. L'immunolocalisation d'AvrM a permis de confirmer sa sécrétion depuis les haustoria vers le cytoplasme de l'hôte (Rafiqi *et al.*, 2010). De même, la

protéine RTP1 (rust transferred protein 1) d'*Uromyces fabae* est sécrétée au niveau des haustoria puis transférée dans les cellules végétales (Kemen *et al.*, 2005). La sécrétion des effecteurs extracellulaires d'*U. maydis* et de *C. fulvum* se fait par les hyphes d'infection extracellulaires (Doehlemann *et al.*, 2009 ; Wulff *et al.*, 2009). Récemment, Kleeman et collaborateurs ont montré que *C. Higginsianum* sécrète des effecteurs candidats au niveau des appressoria, probablement pour faire face aux défenses pré-invasives des cellules sur le point d'être infectées (Kleemann *et al.*, 2012). Chez *M. oryzae*, certains effecteurs sont sécrétés par des BIC (biotrophic interfacial complex), des zones localisées d'hyphes d'infection invaginées dans la membrane plasmique (Khang *et al.*, 2010). Enfin, Nirmala et collaborateurs ont montré que les spores de *P. graminis* f sp *tritici* expriment également des effecteurs (Nirmala *et al.*, 2011). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les champignons utilisent la plupart de leurs structures d'infection pour sécréter des effecteurs et ainsi manipuler les tissus infectés.

3.5.3. Les évidences de localisation intra-cellulaire

Un nombre importants d'effecteurs d'oomycètes et de champignons parasites sont décrits comme étant internalisés dans le cytoplasme des cellules hôtes (Tyler 2012). Cependant, la démonstration directe par immunolocalisation ou à l'aide de fusions avec des marqueurs fluorescents d'un transfert d'effecteur depuis un champignon vers une cellule de plantes infectée n'a été que très rarement effectué (Figure 27). Les protéines *cmu1*, *AvrM*, *RTP1* et *MiSSP7* d'*U. maydis*, *M. lini*, *U. fabae* et *L. bicolor* ont été immunolocalisées respectivement dans les cellules de maïs, de lin, de fève et de racines de peuplier (Djamei *et al.*, 2011 ; Rafiqi *et al.*, 2010, Kemen *et al.*, 2005 ; Plett *et al.*, 2011). D'autre part, les protéines *PWL2* et *BAS1* fusionnées à des marqueurs fluorescents et exprimées par *M. oryzae* sont transférées dans les cellules de riz infectées (Khang *et al.*, 2010). Enfin, la protéine *SP7* fusionnée à la mRFP est transférée dans des cellules d'épiderme d'oignons lorsqu'elle est exprimée de manière ectopique chez *M. oryzae* (Kloppholz *et al.*, 2011). De manière intéressante, les protéines *MiSSP7*, *SP7* et *RTP1* sont localisées dans le noyau de la cellule hôte, ce qui suggère une manipulation possible du programme génétique de la plante.

3.5.4. L'internalisation des effecteurs dans les cellules hôtes: le flou règne

Les hyphes et haustoria des oomycètes et champignons biotrophes pénètrent certes la cavité cellulaire mais respectent strictement l'intégrité des cellules. Les méthodes

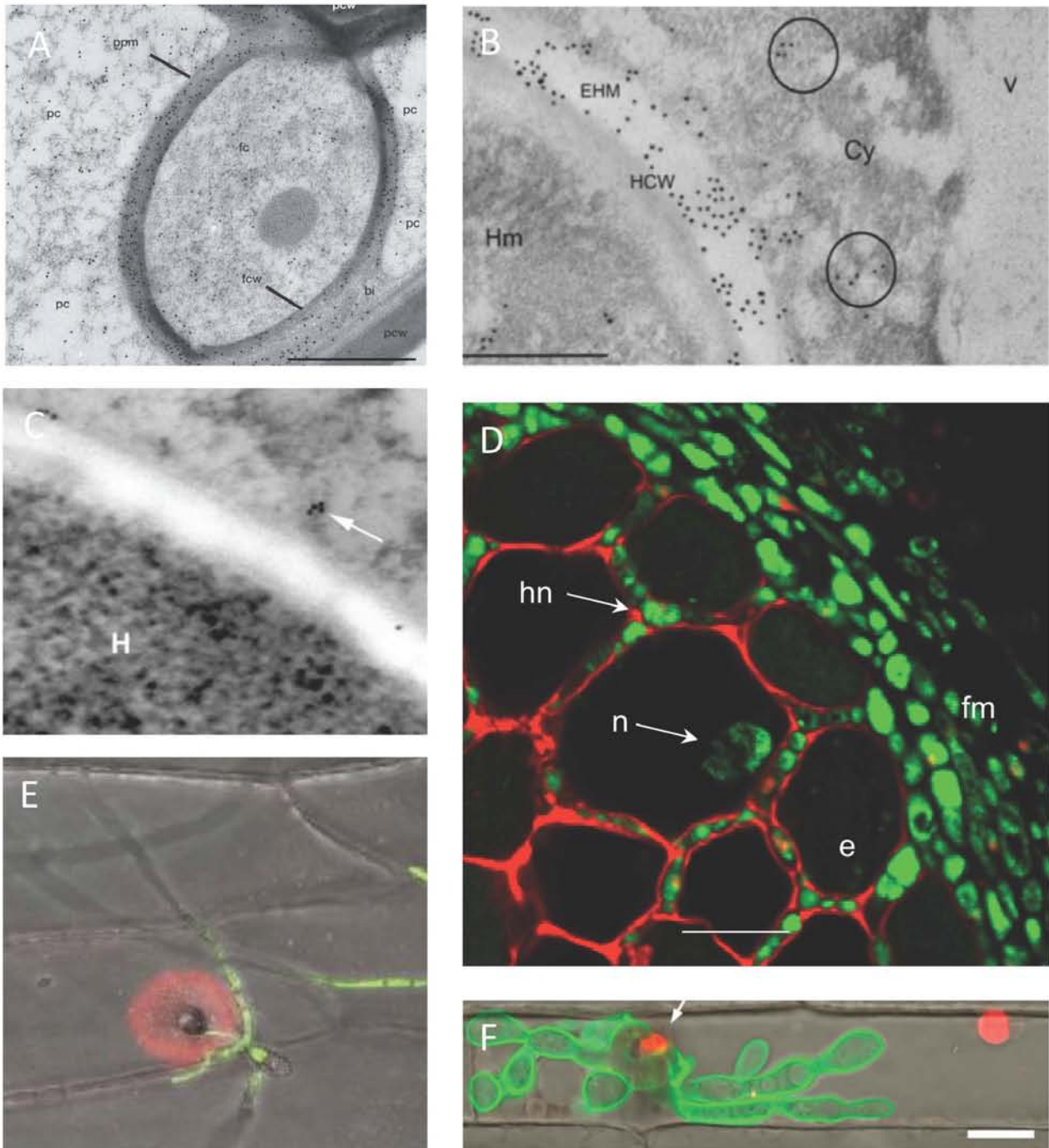


Figure 27. Détection d'effecteurs transloqués depuis un champignon dans une cellule infectée

(A-C) Immunolocalisation, par microscopie électronique à transmission, d'effecteurs transloqués à l'intérieur de cellules végétales infectées. (A) Cmu1 d'*Ustilago maydis* infectant le maïs. ppm: membrane plasmique végétale, pc: cytoplasme végétal, fcw: paroi cellulaire fongique, pcw: paroi cellulaire végétale. (B) AvrM de *Melampsora lini* infectant le lin. Hm: haustorium, Cy: cytoplasme, v: vacuole, hcw: paroi de l'haustorium, ehm: matrice extrahaustoriale. (C) RTP1 (flèche blanche) d'*Uromyces striatus* infectant une fève. H: haustorium. (D) Immunolocalisation, par microscopie à fluorescence, de MiSSP7 de *Laccaria bicolor* colonisant des racines de peuplier. hn: réseau de Hartig, e: root epidermal, n: plant nucleus, fm: manteau fongique. (E) Localisation par microscopie à fluorescence de SP7 de *Glomus intraradices* fusionné à la mRFP (en rouge) et sécrété par *Magnaporthe oryzae* (en vert) dans des cellules d'épiderme d'oignon. (F) Localisation, par microscopie à fluorescence, de la construction PWL2:hH1:mCherry (en rouge) sécrétée par *Magnaporthe oryzae* (en vert) dans des cellules de riz. Le signal rouge marque le BIC et le noyau.

Figure adaptée de (A)-Djamei et al., *Nature*, 2011 / (B)-Rafiqi et al., *The Plant Cell*, 2010 / (C)-Kemen et al., *MPMI*, 2005 / (D)-Plett et al., *Current Biology*, 2011 / (E)-Kloppholz et al., *Current Biology*, 2011 / (F)-Khang et al., *The Plant Cell*, 2010

actuelles pour évaluer la capacité intrinsèque d'un effecteur à entrer dans une cellule hôte repose principalement sur deux méthodes (Kale *et al.*, 2011). La première consiste à exprimer un effecteur dans une cellule végétale avec son signal de sécrétion, puis à mesurer la ré-internalisation de ce dernier. La seconde consiste à mesurer directement l'entrée de protéines recombinantes incubées avec des tissus végétaux. Les effecteurs sont détectés à l'intérieur de la cellule de deux façons : de manière directe par microscopie à fluorescence via un marqueur fluorescent fusionné à l'effecteur ou de manière indirecte par l'observation de nécroses traduisant une HR (un facteur d'avirulence peut être fusionné à l'effecteur, une protéine de résistance exprimée dans les tissus, ou encore la HR peut être indirectement estimée par l'absence d'un signal de viabilité des cellules par coloration GUS). Cette combinaison d'approches a permis à Dou et collaborateurs de montrer que l'effecteur *avr1b* de *P. sojae* est internalisé dans les cellules de soja en l'absence du parasite (Dou *et al.*, 2008). Des mutations ciblées ont révélé que le domaine conservé RXLR est important dans ce processus. En localisant des fusions-GFP exprimées transitoirement chez le tabac et sécrétées dans l'apoplaste, Dodds et collaborateurs ont montré que les effecteurs de *M. lini* sont également ré-internalisés dans les cellules en l'absence de parasites (Dodds *et al.*, 2006 ; Catanzariti *et al.*, 2006 ; Rafiqi *et al.*, 2010). Des mutants de délétion des différents domaines des effecteurs montrent que les domaines importants pour l'internalisation cellulaire sont disposés en région N-terminale, mais que les domaines RXLR dégénérés ne sont pas les déterminants de ce mécanisme (Rafiqi *et al.*, 2010). Il faut remarquer que toutes ces approches suggèrent que des effecteurs entrent à nouveau au sein d'une cellule hôte après leur sécrétion par cette même cellule. Or, il est possible que ces effecteurs aient la capacité de s'extraire des vésicules d'endocytose lors des infections, et un artefact dû à une sortie aspécifique des endosomes vers le cytoplasme lors des expériences en laboratoire ne peut être exclu (Oh *et al.*, 2009). D'autre part, des protéines recombinantes fusionnées à la GFP ou à d'autres marqueurs fluorescents ont permis de suggérer que des effecteurs de champignons et d'oomycètes pénètrent dans les cellules grâce à la liaison du domaine RXLR (ou domaine dégénéré) aux phospholipides (Kale *et al.*, 2010, 2011 ; Plett *et al.*, 2011). Cependant, plusieurs études sont venues contredire la liaison spécifique aux phospholipides via le domaine RXLR ou via les domaines N-terminaux importants pour l'internalisation, démontrant plutôt que des acides aminés basiques du domaine C-terminal des effecteurs seraient impliqués dans la liaison aux

phospholipides, d'une manière complètement indépendante des mécanismes de translocation dans les cellules hôtes (Gan *et al.*, 2010 ; Ellis et Dodds 2011 ; Yaeno *et al.*, 2011). Très récemment, Wawra et collègues ont montré que l'effecteur Avr3a de *P. infestans* peut se fixer aux phospholipides de manière complètement aspécifique, alors qu'il est dénaturé (Wawra *et al.*, 2012a). Cette observation remet profondément en cause la significativité biologique des tests de liaisons aux phospholipides. D'autre part, les mécanismes de translocation des fusions GFP appliquées de façon exogène aux tissus peuvent elles-aussi être aspécifiques (observation personnelle). D'autres pistes de recherche sont explorées pour comprendre comment les effecteurs entrent dans les cellules hôtes. Récemment, l'effecteur SpHtp1 de l'oomycète *Saprolegnia parasitica*, agent pathogène des poissons, a été décrit comme internalisé dans les cellules hôtes via l'interaction avec des molécules tyrosine-O-sulfatées présentes au niveau des membranes (Wawra *et al.*, 2012b). D'autre part, le champignon nécrotrophe *Pyrenophora tritici-repentis* sécrète la protéine toxique ToxA au sein des cellules végétales afin d'induire la mort des cellules (Ciuffetti *et al.*, 2010). L'internalisation de ToxA dépend d'un motif RGD, différent des autres motifs d'acides aminés identifiés chez les effecteurs de biotrophes (Manning *et al.*, 2008). L'identification des mécanismes et des déterminants moléculaires de la translocation des protéines eucaryotes dans les cellules hôtes est actuellement un champ d'investigation extrêmement actif en biologie des effecteurs (Panstruga et Dodds 2009). La capacité des effecteurs à entrer dans les cellules hôtes est un point essentiel de la virulence, l'identification des mécanismes sous-jacents à ce processus pourront vraisemblablement être utilisés pour lutter contre les parasites en inhibant l'entrée de leurs effecteurs dans l'hôte (Kale *et al.*, 2012).

3.5.5. Les champignons augmentent leur portée : la diffusion des effecteurs

Certains effecteurs de *M. oryzae* ont été fusionnés à des marqueurs fluorescents, ce qui a permis d'observer leur sécrétion dans la cellule hôte, mais aussi leur migration dans les tissus, de cellules en cellules (Khang *et al.*, 2010 ; Valent et Khang 2010). Il est probable que cette diffusion serve à préparer l'infection imminente des cellules voisines, étant donné que *M. oryzae* utilise les plasmodesmes pour passer d'une cellule à l'autre et ainsi étendre la zone d'infection (Kankanala *et al.*, 2007). D'autre part, l'effecteur *cmu1* d'*U. maydis* est également capable de diffuser de cellules à cellules chez le maïs, à partir d'une cellule unique transformée par biolistique (Djamei *et al.*, 2011 ; Figure 25). Ainsi, basidiomycètes et ascomycètes semblent utiliser une stratégie similaire pour augmenter

la portée de leurs effecteurs au-delà des cellules infectées. La migration des effecteurs s'effectue probablement de manière symplasmique via les plasmodesmes. Lors du PTI, l'occlusion des plasmodesmes par dépôt de callose a été observée, ce qui démontre l'implication de ces structures dans la lutte contre les infections (Lee et Lu 2011).

4. L'ETI et la relation R - Avr

L'ETI est une réponse de défense forte de la plante qui lui confère une résistance dite qualitative. L'ETI est déclenché suite à la reconnaissance spécifique d'un effecteur (facteur d'avirulence Avr) par un récepteur immunitaire (protéines de résistance R). Quelques couples R - Avr ont été identifiés dans les pathosystèmes plantes-champignons. Actuellement, quatre modèles mécanistiques expliquent les différents types de reconnaissance R - Avr. La manière dont les NB-LRR s'activent pour déclencher l'ETI reste l'objet d'intenses recherches. Dans tous les cas, cette activation mène à des réponses de défense qualitativement semblables à celles du PTI, mais quantitativement plus importantes, notamment avec la mise en place de la HR.

4.1. Les couples R - avr impliquant des effecteurs de champignon

Plusieurs facteurs d'avirulence ont été identifiés chez les champignons, en particulier chez les modèles *Cladosporium fulvum* et *M. lini* desquels découlent les principales avancées historiques (Tableau 4 ; Stergiopoulos et De Wit 2009). Chez *C. fulvum*, les facteurs d'avirulence apoplastiques Avr2, Avr4 et Avr9 sont reconnus par les récepteurs membranaires de type LRR-RLP Cf-2, Cf-4 et Cf-9 respectivement, ce qui entraîne typiquement une HR (Figure 28). La protéine Ve1 de *Verticillium* spp. et la xylanase fongique EIX sont reconnues spécifiquement par des récepteurs membranaires de type LRR-RLP. Ces deux effecteurs sont parfois considérés comme des PAMP et illustrent les limites de la classification PAMP/effecteur et donc PTI/ETI (Thomma et al., 2011). Chez *M. lini* les facteurs d'avirulence AvrM, AvrL567, AvrP4 et AvrP123 entraînent également une HR quand ils sont exprimés dans les plants exprimant les protéines de résistance de type NB-LRR correspondantes (M, L5/L6/L7, P4 et P/P1/P2/P3 ; Ellis et al., 2007). Les couples R - Avr Pi-ta/Avr-Pita et I-2/Six3 ont également été décrits au sein des pathosystèmes riz-*M. oryzae* et tomate-*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, respectivement. Pi-ta et I-2 sont également des protéines cytoplasmiques de type NB-LRR.

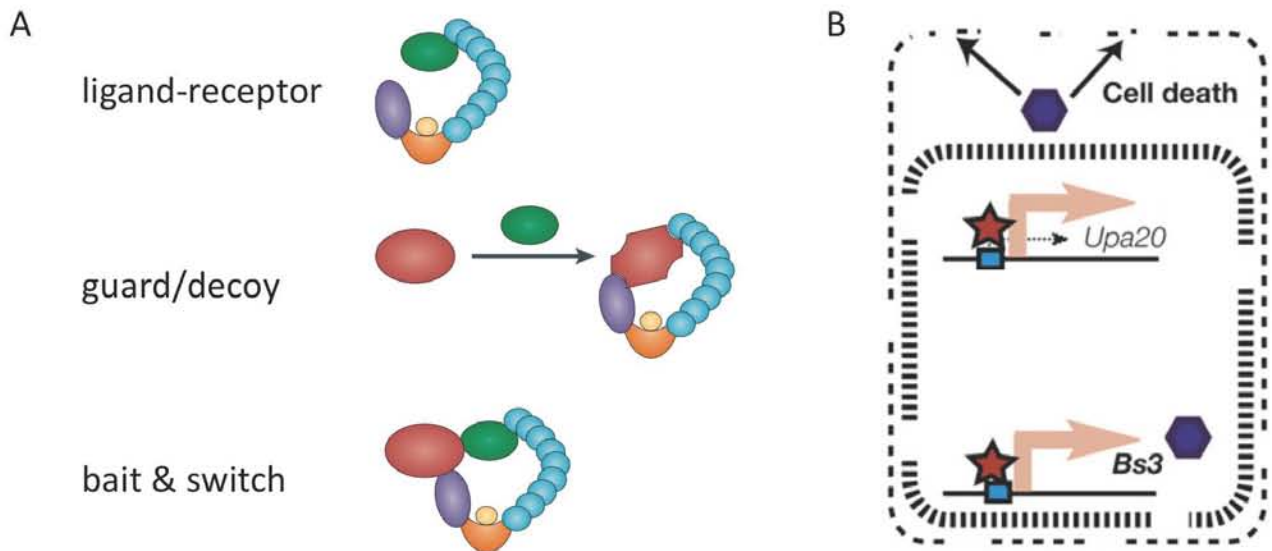
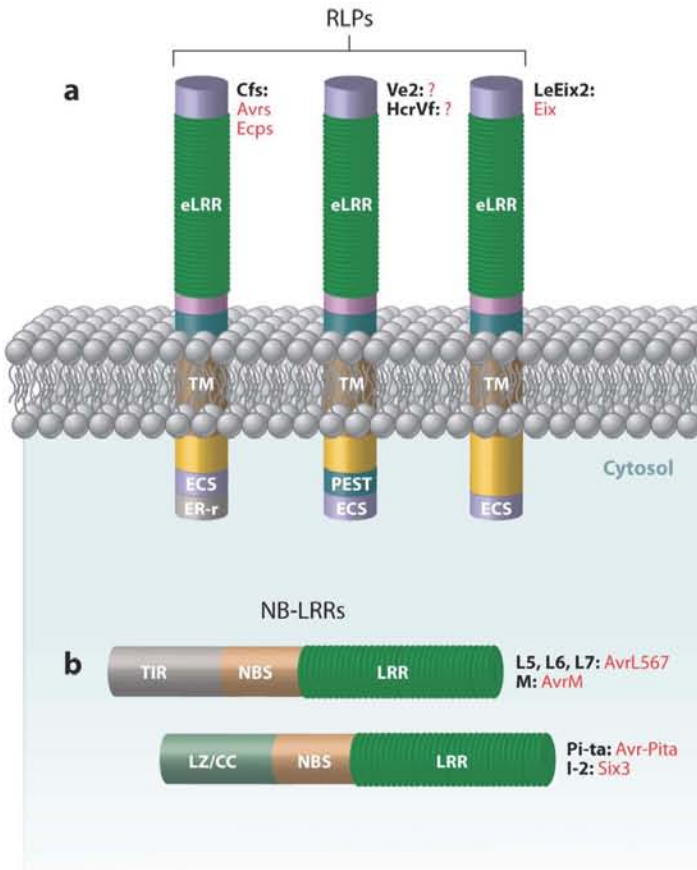


Figure 29. Modèles d'interactions R – Avr

(A) Les quatre modèles de reconnaissance des facteurs d'avirulence (en vert) par des protéines de résistance (de type NB-LRR ici; LRR, bleu; NB, orange; ATP/ADP, jaune; TIR/CC, violet) sont représentés. La cible de virulence ou le leurre est en rouge. (B) L'effecteur AvrBs3 (étoile rouge) de *Xanthomonas* cible un promoteur (rectangle bleu) présent en amont du gène *Upa20* pour activer son expression et favoriser la virulence. Un promoteur situé en amont du gène de résistance *Bs3* leurre AvrBs3 pour induire l'expression de la flavine monooxygénase *Bs3* qui promeut la mort cellulaire et la résistance aux bactéries. Les tirets fins indiquent la membrane plasmique et les tirets épais la membrane nucléaire.

Dodds et Rathjen, Nature Reviews in Genetics, 2010 / Saijo et Schulze-Lefert, Cell Host & Microbe, 2008

4.2. Les modèles d'interaction R – Avr

Dans la cadre de la relation R – Avr, un facteur d'avirulence peut interagir avec une protéine de résistance (interaction protéine-protéine) ou avec le promoteur d'un gène de résistance (interaction ADN-protéine).

4.2.1. L'interaction protéine-protéine

Actuellement, on considère que les protéines de résistance R reconnaissent les facteurs d'avirulence selon quatre modes distincts, expliqués dans les modèles mécanistiques suivants : i) le modèle ligand-récepteur, ii) le modèle de garde, iii) le modèle du leurre et enfin iv) le modèle dit 'appâter et s'activer' (Figure 29). Le modèle ligand-récepteur est l'explication la plus simple pour expliquer la relation gène-pour-gène : les produits de ces gènes interagissent directement et physiquement. Ce modèle a été démontré entre autres grâce aux recherches menées sur le couple AvrL567/L5, L6 du pathosystème lin-rouille du lin, qui a mis en évidence une corrélation directe entre l'interaction R - Avr *in vivo* et l'interaction incompatible du lin portant l'allèle R avec les souches de *M. lini* portant l'allèle Avr correspondant (Dodds *et al.*, 2006). De même, Pi-ta et Avr-Pita interagissent *in vivo* (Jia *et al.*, 2000). Cependant, la grande majorité des couples R - Avr décrits chez les bactéries n'interagissent pas physiquement (Ma et Guttman 2008). Cette observation a entraîné la formulation du modèle de garde (Dangl et Jones 2001). Ce modèle spécifie que les protéines de résistance interagissent physiquement avec des cibles d'effecteurs 'gardées' et perçoivent la perturbation engendrée par l'action de l'effecteur sur sa cible. C'est le cas par exemple d'Avr2 de *C. fulvum*, qui interagit avec la protéase Rcr3 dans l'espace extracellulaire. La présence de Rcr3 est nécessaire à la reconnaissance d'Avr2 par la protéine de résistance Cf-2 de la tomate (Kruger *et al.*, 2002). D'une certaine manière, les protéines gardées sont modifiées par des molécules du parasite et contribuent à la mise en place des réponses de défense, ce qui correspond à la définition d'un DAMP (Boller et Felix 2009). Le premier exemple de l'application du modèle de garde impliquant un effecteur d'oomycète, Avr2 de *P. infestans*, a été rapporté récemment (Saunders *et al.*, 2012). Considérant le fort polymorphisme de présence/absence des gènes R dans les populations naturelles, deux pressions de sélection opposées s'appliquent aux protéines gardées et mènent au renforcement ou à la diminution de la force de l'interaction avec l'effecteur respectivement en la présence et en l'absence du gène R. Cette observation a mené à l'établissement du modèle du leurre, qui stipule que la plante a développé au cours de l'évolution, des leurres qui se

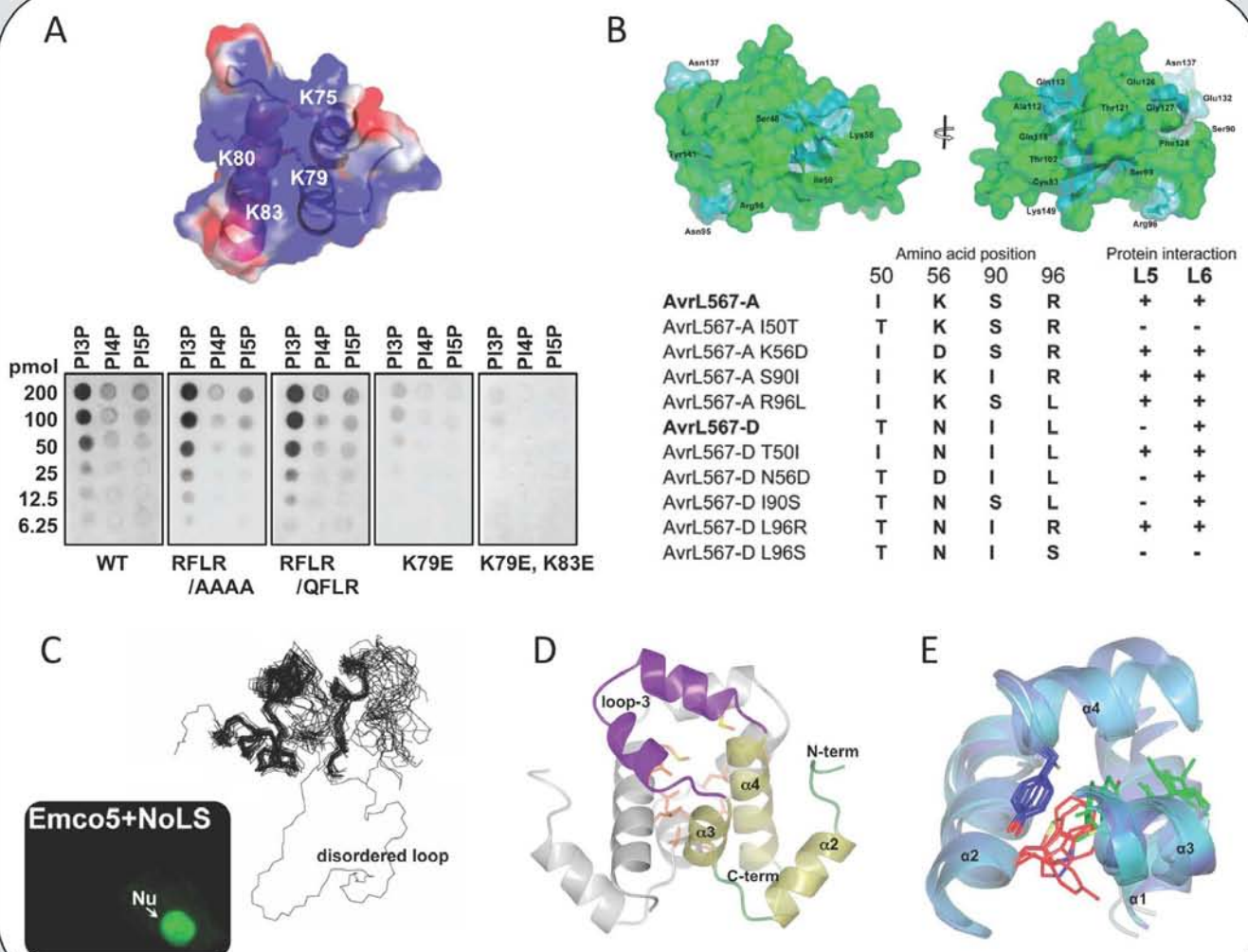
spécialisent dans la perception de l'effecteur en mimant les cibles de virulence (Van Der Hoorn et Kamoun 2008). Par exemple, les effecteurs AvrPto et AvrPtoB ciblent les domaines kinases de plusieurs PRR ainsi que la protéine kinase cytoplasmique Pto. L'interaction avec Pto ne bénéficie pas à la virulence, mais active le NB-LRR Prf et subséquemment l'ETI. Pto apparaît comme une kinase gardée qui 'leurre' les effecteurs en mimant les domaines cytoplasmiques des PRR (Hahn et Boller 2012). Le modèle 'appâter et activer' (bait-and-switch en anglais) est à l'intersection du modèle de garde et du modèle ligand-récepteur. Il décrit l'interaction physique entre une protéine R et un effecteur qui intervient alors que les deux protéines interagissent avec la cible de virulence de l'effecteur, qui sert de plateforme pour l'interaction (Collier et Moffet 2009). La résolution récente des premières structures d'effecteurs de champignons et d'oomycètes a permis de mieux comprendre la façon dont ces protéines interagissent avec des partenaires, que ce soit des récepteurs immunitaires ou d'autres molécules, et de mieux cerner comment la co-évolution avec les plantes a entraîné la diversification de ces effecteurs (Encadré 3).

4.2.2. L'interaction promoteur-protéine

Chez le piment, le gène de résistance atypique *Bs3* code une flavine monooxygénase, qui est une protéine généralement impliquée dans la détoxification de xénobiotiques (Römer *et al.*, 2007). Le facteur d'avirulence associé à ce gène de résistance, AvrBs3, est un effecteur TAL de *Xanthomonas campestris* qui s'associe physiquement au promoteur de *Bs3* et induit son expression, menant à l'incompatibilité. De manière intéressante, le promoteur de *Bs3* est similaire aux promoteurs des gènes de susceptibilité ciblés par AvrBs3 pour promouvoir la virulence des bactéries. Ce mécanisme, bien qu'impliquant un promoteur de gène de résistance au lieu d'une protéine de résistance, correspond au modèle du leurre présenté précédemment : les plantes ont développé au cours de leur évolution des promoteurs leurres permettant d'utiliser directement un effecteur pour activer l'expression d'un gène de défense, en mimant le promoteur de la 'cible de virulence' (Van der Hoorn et Kamoun 2008). La manière dont la protéine Bs3 contribue à la résistance du piment reste à déterminer. La création de promoteurs capables de spécifiquement leurrer les effecteurs TAL et ainsi de permettre la résistance de la plante est une approche utilisée pour améliorer les plantes susceptibles aux bactéries *Xanthomonas* spp. (Römer *et al.*, 2009 ; Hummel *et al.*, 2012).

Encadré 3. Apports des structures 3D pour la compréhension des effecteurs d'eucaryotes

La résolution de la structure tridimensionnelle (3D) de protéines effectrices permet généralement d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction de l'effecteur avec d'autres molécules. Par exemple, les acides aminés formant une surface chargée positivement sont nécessaires à *avr1b* de *P. sojae* pour interagir avec des phospholipides (A; Yaeno et al., 2011). De même, des acides aminés exposés et polymorphes d'AvrL567 de *M. lini* sont déterminants pour l'interaction avec les récepteurs immunitaires NB-LRR L5 et L6 du lin (B; Wang et al., 2007). Les informations 3D peuvent aussi être connectées à la localisation de l'effecteur. En effet, la résolution de la structure 3D d'ATR13 de *H. arabidopsidis* a révélé un domaine désordonné impliqué dans la localisation nucléaire de la protéine (C; Leonelli et al., 2011). L'état d'oligomérisation d'un effecteur peut également être caractérisé via la structure 3D, comme c'est le cas par exemple pour PexRD2 de *P. infestans* (D; Boutemy et al., 2011). Enfin, la comparaison récente de plusieurs structure 3D a permis de déceler la présence d'un noyau structural conservé servant de base structurale à la diversification de nombreux effecteurs d'oomycètes (E; Win et al., 2012).



4.3. L'activation des protéines NB-LRR

L'activation d'un NB-LRR mène le plus souvent à une HR et donc à la mort cellulaire. Un phénotype si radical associé à l'activation de ces protéines nécessite une régulation fine afin d'éviter un état auto-actif qui serait non viable pour la plante, sans toutefois empêcher l'activation des protéines lors de la reconnaissance d'un effecteur. Le modèle proposé récemment par Takken et Goverse présente les NB-LRR, dont la partie N-terminale est de type TIR (TIR-NB-LRR, TNL) ou CC (CC-NB-LRR, CNL), dans des états inactifs en absence d'effecteurs. Cet état inactif est maintenu par des interactions intramoléculaires entre les différents domaines des protéines (Figure 30 ; Takken et Goverse 2012). Une cohorte de chaperonnes est impliquée dans le repliement correct des protéines, tandis que la dégradation de celles qui sont mal repliées est assurée par un système dépendant du protéasome. Les protéines inactives lient de l'ADP par leur domaine NB-ARC. Suite à la reconnaissance directe ou indirecte d'un effecteur, les NB-LRR s'activent en liant de l'ATP. De récentes études structure/fonction sur les protéines L6 du lin et MLA de l'orge ont révélé que les TNL et les CNL doivent former des dimères via leur domaines TIR et CC respectivement, afin de déclencher la signalisation (Bernoux *et al.*, 2011a ; Maekawa *et al.*, 2011). Enfin, certains NB-LRR tels que MLA ou Rx de la pomme de terre font l'objet d'un trafic nucléo-cytoplasmique qui pourrait être impliqué dans la régulation des gènes de défense, tandis que d'autres comme L6 ou encore RPM1 d'arabidopsis agissent au niveau des membranes (Bernoux *et al.*, 2011b). La lyse de l'ATP renvoie les NB-LRR dans des états inactifs où ils sont de nouveau liés à de l'ADP.

4.4. Réponses de défense de l'ETI : le PTI en plus fort

On considère actuellement que PTI et ETI reposent sur les mêmes voies de signalisation et entraînent les mêmes réponses de défense, qui ne diffèrent que de manière quantitative. L'analyse du transcriptome d'arabidopsis infectée par des bactéries virulentes ou avirulentes a révélé que les réponses menant à la compatibilité ou à l'incompatibilité reposent sur l'induction des mêmes gènes de défense (Figure 31 ; Tao *et al.*, 2003 ; Eulgem 2004). Chez le peuplier, l'expression des gènes codant des protéines PR, des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes ou encore des enzymes impliquées dans les réactions redox est induite à la fois lors de relations incompatibles précoces mais également lors des relations compatibles tardives avec *Melampsora spp.* (Rinaldi *et al.*, 2007 ; Miranda *et al.*, 2007 ; Azaiez *et al.*, 2009 ; Duplessis *et al.* 2009). Ces observations supportent les résultats obtenus chez arabidopsis, à savoir que les gènes

Chapitre I

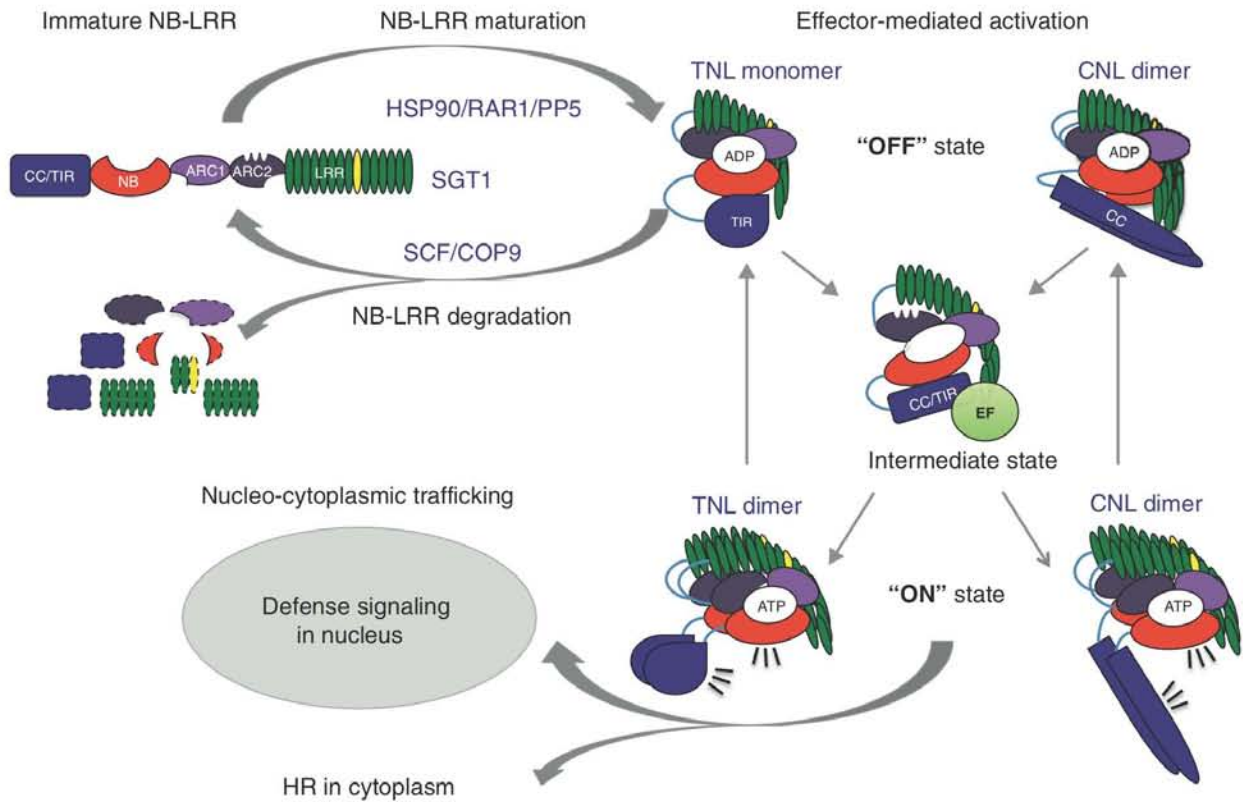


Figure 30. Modèle d'activation des NB-LRR

Les NB-LRR de type TNL ou CNL sont dans des états inactifs (off) en absence d'effecteurs. Les chaperons HSP90, RAR1 et PP5 sont impliqués dans le repliement correct des protéines, tandis que la dégradation de celles qui sont mal repliées dépend d'un système dépendant du protéasome. Ces protéines inactives lient de l'ADP au niveau de leur domaine NB-ARC. Suite à la reconnaissance directe ou indirecte d'un effecteur, les NB-LRR adoptent un état actif (on) dans lequel ils lient de l'ATP. TNL et CNL forment des dimères via leurs domaines TIR et CC, respectivement. Certains NB-LRR font l'objet d'un trafic nucléo-cytoplasmique. La lyse de l'ATP renvoie les NB-LRR dans des états inactifs dans lesquels ils sont liés à de l'ADP.

Takken et Goverse, Current Opinion in Plant Biology, 2012

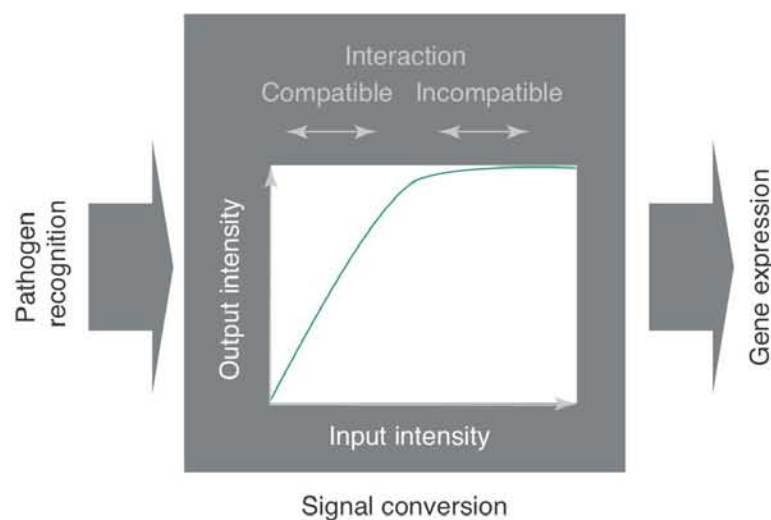


Figure 31. La différence quantitative PTI/ETI

Les réponses de défense des plantes (output intensity) sont qualitativement les mêmes lors des interactions compatibles et incompatibles, mais quantitativement plus importantes lors de l'incompatibilité. Elles sont fonction de l'intensité du signal d'entrée (input intensity) qui fait suite à la détection des parasites.

Eulgem, Trends in Plant Science, 2004

de défense mobilisés durant les résistances hôte-spécifiques et basales sont globalement les mêmes. Tsuda et collaborateurs ont montré par l'analyse de mutants des voies de biosynthèse des hormones que les voies de signalisation menant à la défense chez *Arabidopsis* sont multiples, redondantes et surtout communes au PTI et à l'ETI (Tsuda *et al.*, 2009). L'aspect quantitatif des réponses de défense semble donc dépendre de la manière dont sont activées les voies de signalisation. D'autre part, des approches génétiques par perte de fonction ont permis de définir environ 25 protéines intervenant dans la voie de signalisation de l'ETI déclenchée par le complexe Prf-Pto-AvrPto (ou AvrPtoB) chez la tomate (Oh et Martin 2011). Ces protéines sont impliquées dans les réponses physiologiques classiquement associées au PTI telles que les cascades MAPK, la production de ROS et d'hormones, la régulation des gènes de défense et la sécrétion des protéines PR (Figure 32 ; Tsuda et Katagiri 2010). De même que la distinction PAMP/effecteur est parfois délicate, la nature commune des réponses de défense dissipe davantage la frontière séparant PTI et ETI (Thomma *et al.*, 2011). La HR a longtemps été considérée comme la marque typique de l'ETI, mais plusieurs travaux ont montré que des éliciteurs peuvent également la déclencher (Tsuda et Katagiri 2010). Le modèle en zigzag a le mérite d'avoir permis de réunifier deux écoles de recherche se focalisant respectivement sur les éliciteurs et le PTI d'une part et les effecteurs et l'ETI d'autre part (Zipfel et Robatzek 2010). Dans le futur, les distinctions éliciteur/effecteur, PRR/protéine de résistance et PTI/ETI sont des concepts qui seront vraisemblablement amenés à évoluer pour se fondre dans une vision plus intégrée des interactions plantes-parasites (Thomma *et al.*, 2011).

5. Le zigzag à l'échelle de l'évolution

La dernière phase du modèle en zigzag décrit comment la relation R – Avr évolue à l'échelle micro-évolutive et au niveau des populations, déterminant l'issue des interactions. L'évolution rapide des répertoires d'effecteurs des parasites est vraisemblablement une conséquence de la course évolutive engagée avec les plantes et leurs systèmes de défense. Au niveau des génomes, la richesse en éléments transposables semble être un moteur important de la diversification de ces répertoires. Enfin, les effecteurs jouent un rôle important dans la définition du spectre d'hôte d'un parasite, et la plasticité des répertoires d'effecteurs permet d'expliquer la persistance des parasites spécialisés à l'échelle macro-évolutive.

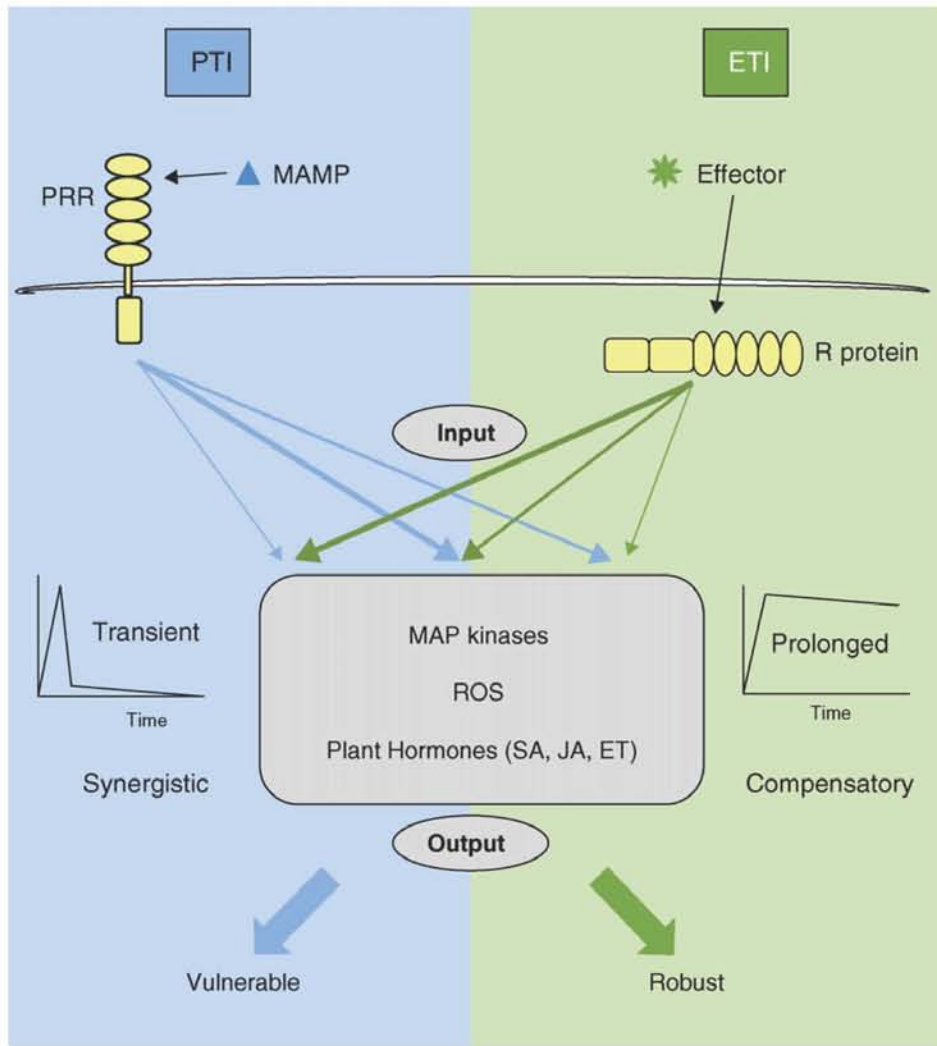


Figure 32. PTI et ETI empruntent des voies de signalisation similaires

Le PTI et l'ETI empruntent les mêmes voies de signalisation mais les sollicitent d'une manière différente, ce qui mène à une défense modérée dans le cas du PTI et soutenue dans le cas de l'ETI.

Tsuda et Katagiri, Current Opinion in Plant Science, 2010

5.1. La suppression de l'ETI

Deux mécanismes permettent à un agent pathogène d'échapper à l'ETI : par délétion/mutation ou répression transcriptionnelle du facteur d'avirulence, ce qui permet d'éviter la reconnaissance par la plante hôte, ou par le développement de nouveaux facteurs de virulence capables d'interférer avec la mise en place de l'ETI.

5.1.1. La perte du facteur d'avirulence responsable de l'ETI

La perte par délétion d'un facteur d'avirulence suffit à inhiber l'ETI et restaurer la virulence (si le facteur d'avirulence n'a pas un rôle essentiel dans la virulence). Cette démonstration a été faite expérimentalement sur le système lin-*M. lini*, où les souches de champignon portant le gène *AvrL567* ne peuvent pas se développer sur les cultivars de lin porteurs du gène *L6*, selon la relation R – Avr (Ellis *et al.*, 2007). En effet, une souche pour laquelle l'expression d'*AvrL567* est réprimée par interférence à l'ARN est redevenue virulente sur les lignées *L6*, démontrant ainsi la fonction d'avirulence d'*AvrL567* (Lawrence *et al.*, 2009). D'autres gènes codants des effecteurs et dont la délétion a permis de contourner l'ETI ont été identifiés chez *C. fulvum* (*Avr9*), *Leptosphaeria maculans* (*AvrLm1*, *AvrLm4-7*) ou encore *Rhynchosoprium secalis* (*Nip1* ; Stergiopoulos et De Wit 2009). De façon notoire, des expériences d'évolution artificielle de populations bactériennes conduites en laboratoire ont montré qu'en seulement 6 cycles d'infection, les bactéries ont perdu un facteur d'avirulence et sont devenues virulentes sur un même hôte (Pitman *et al.*, 2005). Cette expérience illustre à quel point les microbes peuvent développer rapidement de nouvelles virulences par la perte de gènes d'avirulence. L'accumulation de mutations pour un effecteur permet d'éviter l'interaction avec les récepteurs immunitaires, empêchant ainsi la mise en place de l'ETI. Ce type de mécanisme a également été démontré chez *M. lini*, où *AvrL567* présente des signatures d'évolution sous pression de sélection positive (Dodds *et al.*, 2006). La stricte corrélation entre l'interaction physique *AvrL567-L5/L6/L7* en levure et l'induction des réponses de défense menant à une HR chez le lin tend à démontrer que l'accumulation de polymorphisme au cours de l'évolution permet d'échapper à la reconnaissance par les protéines de résistance. De même chez les oomycètes *P. sojae*, *P. ramorum* et *H. arabidopsidis*, quasiment les deux tiers des effecteurs de type RXLR présentent des signatures d'évolution sous pression de sélection au sein de leur domaine C-terminal, anticipé comme étant le domaine fonctionnel *in planta* (Win *et al.*, 2007 ; Figure 33). Comme pour les observations réalisées chez *M. lini*, la mutation d'un nombre restreint

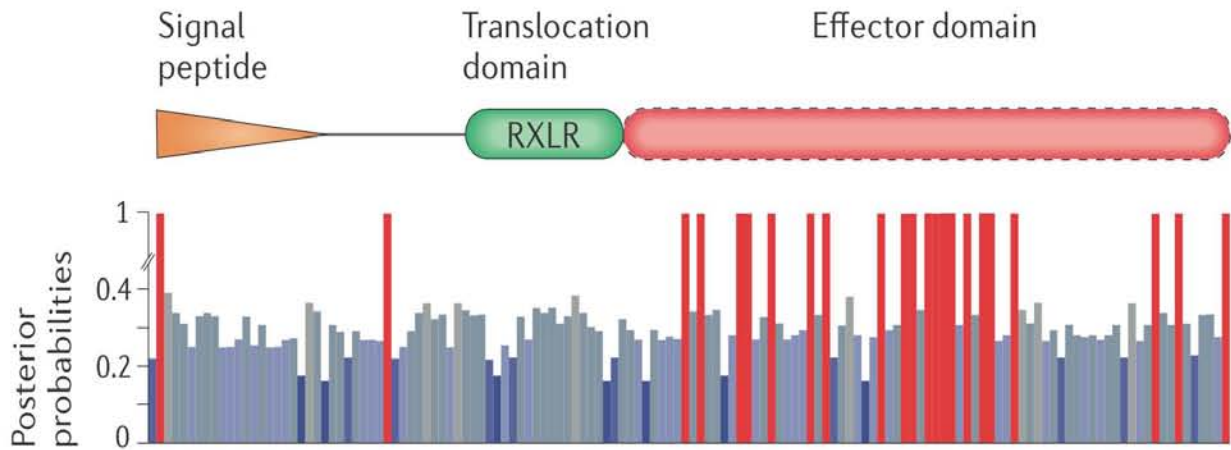


Figure 33. Les signatures de pression de sélection positive chez les effecteurs RXLR

Les barres rouges indiquent que les résidus évoluent sous pression de sélection positive (ou diversifiante). Typiquement, les effecteurs de *P. infestans* présentent de nombreux résidus avec ces signatures en C-terminal.
Raffaele et Kamoun, Nature Reviews in Microbiology, 2012

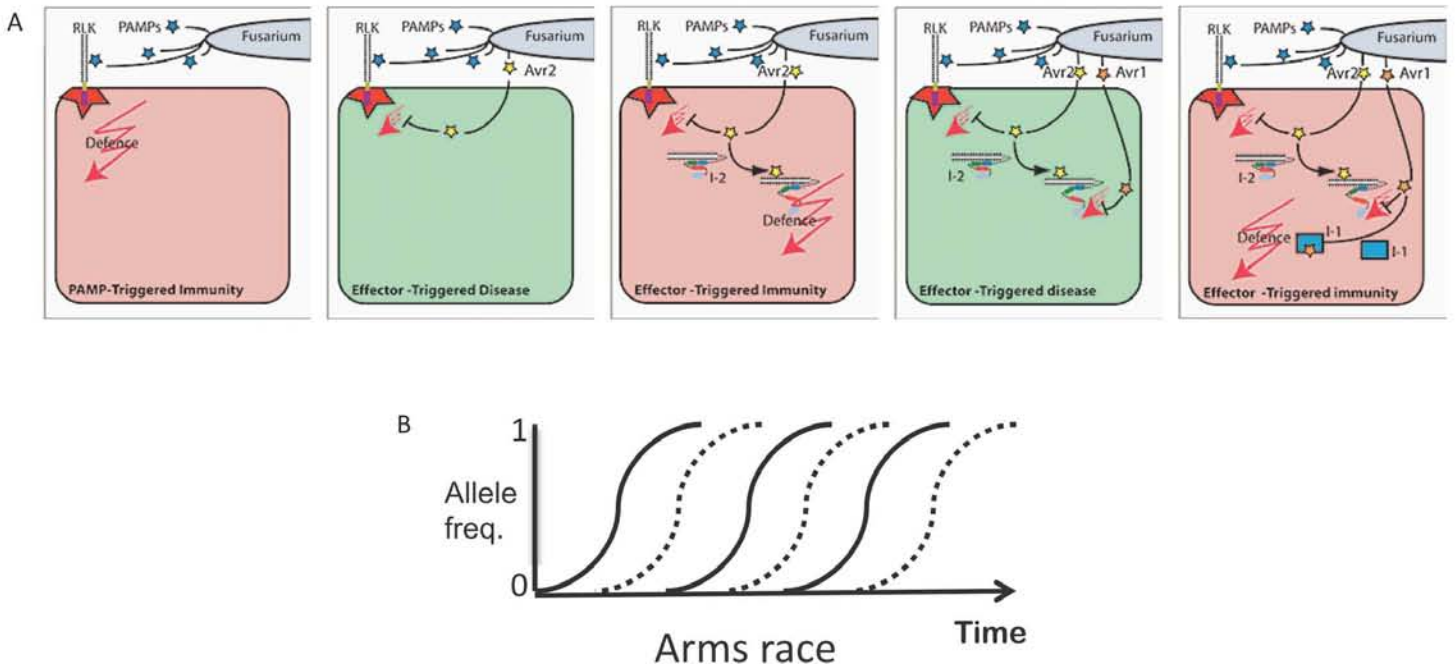


Figure 34. L'évolution de facteurs de virulence supprimant l'ETI chez les champignons

(A) De gauche à droite: les PAMP de *Fusarium* déclenchent le PTI chez la tomate. L'effecteur Avr2 inhibe le PTI. La protéine de résistance I-2 reconnaît Avr2 et déclenche l'ETI. L'effecteur Avr1 inhibe l'ETI déclenché par I-2. La protéine de résistance I-1 reconnaît Avr1 et déclenche l'ETI. (B) L'évolution de nouveaux facteurs de virulence et de nouvelles protéines de résistance peut être modélisée sous la forme d'une course aux armements. Dans ce modèle, un parasite acquiert un effecteur qui lui confère un avantage sélectif, entraînant la dispersion de l'allèle dans les populations (trait plein). En réponse, un allèle permettant aux plantes de mieux résister aux parasites porteurs de cet effecteur se disperse à son tour dans les population d'hôtes (trait en pointillés).

Takken et Rep, MPP, 2010 / Terauchi et Yoshida, New Phytologist, 2010

d'acides aminés au sein de la séquence d'Avr3a de *P. infestans* permet d'échapper à la reconnaissance par la protéine de résistance R3a de la pomme de terre (Bos *et al.*, 2009). D'autre part, un polymorphisme transcriptionnel entraînant l'absence d'expression d'un facteur d'avirulence donné va permettre d'éviter sa reconnaissance. Par exemple, Qutob et collaborateurs ont observé qu'un tel polymorphisme s'applique à *Avr1a* et *Avr3a* au sein de différentes souches de *P. sojae* (Qutob *et al.*, 2009). Les modifications épigénétiques de la chromatine sont connues comme affectant la régulation des gènes, et de manière intéressante les gènes impliqués dans ce mécanisme évoluent rapidement au sein du génome de *P. infestans*, conjointement avec les gènes codant des effecteurs (Raffaele *et al.*, 2010). Chez les bactéries *P. syringae* pv. *tomato*, l'absence de l'expression d'AvrPto et d'AvrPtoB leur permet d'être virulentes sur les plants de tomate porteurs du gène de résistance *Pto* (Kunkeaw *et al.*, 2010). Ainsi, le polymorphisme transcriptionnel pourrait être également un mécanisme largement répandu chez les parasites biotrophes, procaryotes ou eucaryotes, pour contourner l'ETI et permettre l'évolution de nouvelles virulences. L'observation que, parmi les centaines d'effecteurs RXLR de *P. infestans*, seul un tiers est induit lors de la colonisation biotrophe supporte l'idée de polymorphisme transcriptionnel qui permettrait d'éviter l'ETI, tout en conservant le gène au sein du génome (Raffaele et Kamoun 2012).

5.1.2 Le gain d'un facteur de virulence supprimant l'ETI

Chez *P. syringae* pv. *tomato*, beaucoup d'effecteurs peuvent supprimer l'ETI (Guo *et al.*, 2009 ; Lindeberg *et al.*, 2012). Cela révèle que la suppression de l'ETI est une fonction importante dans les mécanismes de virulence, puisqu'elle a été retenue au cours de l'évolution. Au sein du pathosystème tomate-*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, les protéines de résistance I-2 et I-3 reconnaissent respectivement les effecteurs Avr2 et Avr3, ce qui déclenche l'ETI et confère la résistance (Takken et Rep 2010). L'effecteur Avr1 permet d'inhiber l'ETI déclenché par ces deux couples R – Avr, ce qui démontre qu'à l'instar des bactéries, les champignons ont également développé la capacité d'inhiber l'ETI (Houterman *et al.*, 2008 ; Figure 34A). Récemment, deux études ont rapporté l'identification des premiers composants des voies de signalisation de l'ETI ciblés par des effecteurs, ouvrant de nouvelles perspectives pour mieux comprendre la manière dont les effecteurs suppriment l'ETI (Heidrich *et al.*, 2011 ; Bhattacharjee *et al.*, 2011). Ces études ont notamment mis en lumière le rôle central de la protéine EDS1 (enhanced disease susceptibility 1). En effet, EDS1 interagit avec plusieurs protéines de résistance

de type NB-LRR, elle est ciblée par plusieurs effecteurs bactériens et joue un rôle important dans la mise en place de l'ETI.

5.2. Restauration de l'ETI et évolution des gènes de résistance chez les plantes

Le concept de la course aux armements suggère que chaque nouvelle virulence impose une pression de sélection qui mène à l'évolution d'une nouvelle résistance et *vice-versa* (Figure 34B). Beaucoup d'effecteurs capables de supprimer l'ETI sont également capables de la déclencher. C'est le cas par exemple d'AvrRpm1 ou AvrRpt2 chez *P. syringae* pv. *tomato*, ou encore d'Avr1 chez *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lindeberg *et al.*, 2012 ; Houterman *et al.*, 2008). Les plantes ont ainsi la capacité de développer de nouveaux récepteurs capables de reconnaître des effecteurs de manière à restaurer l'ETI. L'augmentation en nombre et la diversification des gènes codant des protéines de résistance chez les plantes semblent être le mécanisme qui permet l'apparition de nouvelles résistances. A l'échelle des génomes entiers, les gènes NB-LRR ont subi une forte expansion et diversification au cours de l'évolution (Meyers *et al.*, 2003 ; Yue *et al.*, 2012). Cela est également vrai pour d'autres récepteurs du système immunitaire comme les RLP ou les RLK chez *Arabidopsis* (Fritz *et al.*, 2005 ; Lehti-shiu *et al.*, 2009). De manière spécifique, cette expansion est la conséquence de duplications à l'échelle du génome entier. Par exemple, *Arabidopsis* a subi trois événements distincts de ce genre, tandis que la quasi-totalité du génome du peuplier a subi une duplication majeure il y a environ 65 millions d'années, qui a donné lieu à l'apparition de 8000 nouveaux gènes paralogues (Proost *et al.*, 2011 ; Tuskan *et al.*, 2006). Plus spécifiquement, des duplications en tandem, vraisemblablement liées à l'activité d'éléments transposables, permettent de générer de nouveaux gènes liés à l'immunité comme les NB-LRR chez le peuplier (Kohler *et al.*, 2008). D'autre part, des signatures d'évolution sous pression de sélection positive ont été identifiées au sein des domaines LRR des gènes codant les protéines de résistance MLA chez l'orge, L5 chez le lin ou encore RPP13 chez *Arabidopsis* (Seeholzer *et al.*, 2010 ; Ravensdale *et al.*, 2011 ; Rose *et al.*, 2004). Ainsi, le fort polymorphisme observé chez ces gènes suggère que l'apparition de nouvelles capacités de reconnaissance a été favorisée par des mutations. Récemment, deux études de génomique comparative ont révélé que les gènes les plus variables au sein des populations d'*Arabidopsis* sont ceux codant des NB-LRR, des protéines F-box, des défensines et des RLK (Gan *et al.*, 2011 ; Cao *et al.*, 2011). Ces observations mettent en lumière la diversification des gènes de résistance chez les plantes au cours de leur

évolution. Pour conclure, le nombre élevé de gènes codant des protéines de résistance et leur variabilité au sein des génomes et des populations permet aux plantes de développer de nouvelles résistances aux parasites.

5.3. Les répertoire d'effecteurs dans la co-évolution plantes-parasites biotrophes

L'évolution vers le mode de vie biotrophe a eu lieu plusieurs fois de manière convergente chez les eucaryotes. On observe cependant des propriétés semblables au niveau des génomes des parasites biotrophes. Certains effecteurs déterminent le spectre d'hôtes, tandis que l'évolution rapide des génomes et notamment des répertoires d'effecteurs semble être la clef de la survie des parasites spécialisés à l'échelle macro-évolutive.

5.3.1. Evolution des champignons et oomycètes parasites biotrophes

Au cours de l'évolution des champignons et oomycètes parasites des plantes, le mode de vie biotrophe est apparu plusieurs fois de manière convergente (Kemen et Jones 2012 ; Figure 35). Un modèle proposé récemment par Spanu décrit la saprotrophie des microorganismes comme le mode de vie basal à partir duquel certaines espèces évoluent en se spécialisant vers la biotrophie ou la nécrotrophie de manière définitive (Spanu 2012 ; Spanu et Kamper 2010 ; Figure 36). Les approches de génomique comparative ont montré que bien que la biotrophie soit apparue de manière convergente au cours de l'évolution, les génomes des organismes biotrophes partagent certaines propriétés structurales (Spanu 2012). Notamment, l'augmentation de la taille des génomes ainsi que la perte et l'obtention de nouveaux gènes sont les événements majeurs associés à l'évolution vers le parasitisme biotrophe (Raffaele et Kamoun 2012). Par exemple, les ascomycètes agents des mildious (e.g. *B. graminis*, *Golovinomyces orontii* ou *Erysiphe pisi*) présentent des génomes d'environ 140 Mb, soit 4 fois la taille de ceux d'espèces nécrotrophes phylogénétiquement proches comme *Botrytis* spp. ou *Sclerotinia* spp. (Spanu et al., 2010). Cette augmentation de taille a été engendrée par l'activité de nombreux éléments transposables qui peuvent représenter plus de la moitié du génome des parasites biotrophes dans certains cas (Raffaele et Kamoun 2012). Les biotrophes obligatoires comme les agents des rouilles ou des mildious fongiques, ou encore les oomycètes *H. arabidopsidis* et *A. laibachii* ont généralement perdu les gènes impliqués dans des fonctions telles que l'assimilation de l'azote et du soufre inorganiques, la dégradation des parois (perte de gènes codant des CAZymes [carbohydre active enzymes]) ou encore la production de métabolites secondaires

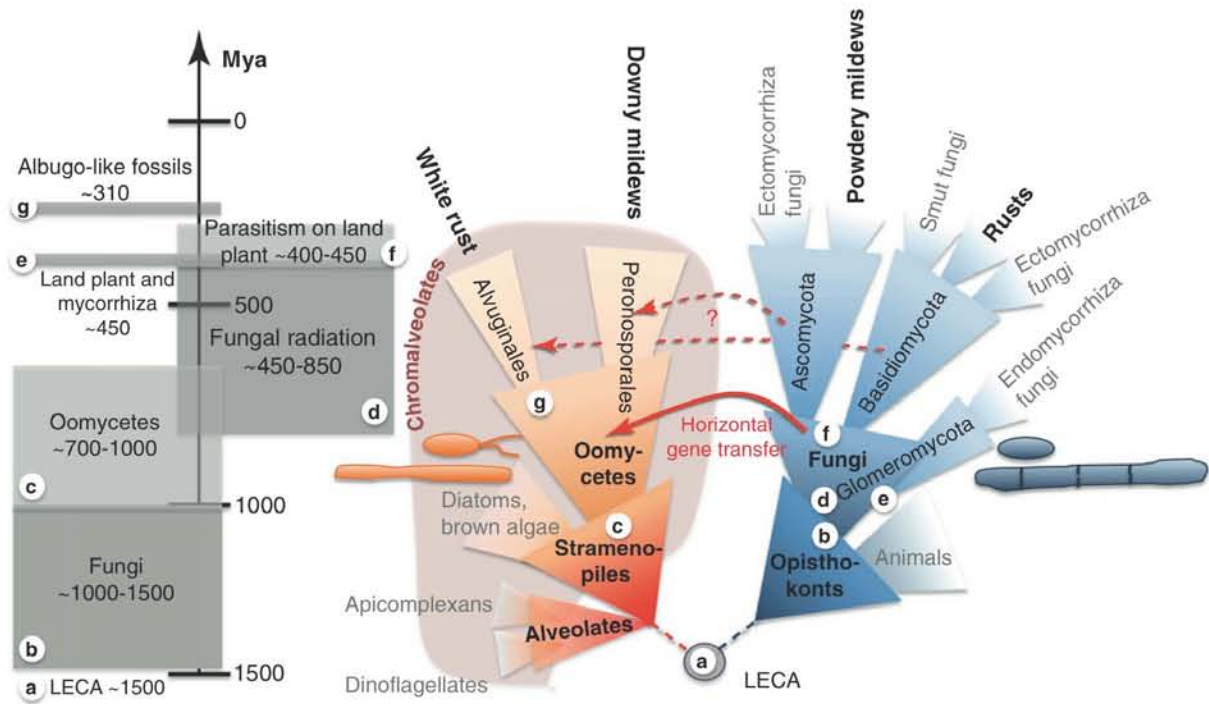


Figure 35. Evolution du mode de vie biotrophe chez les agents pathogènes filamenteux des plantes

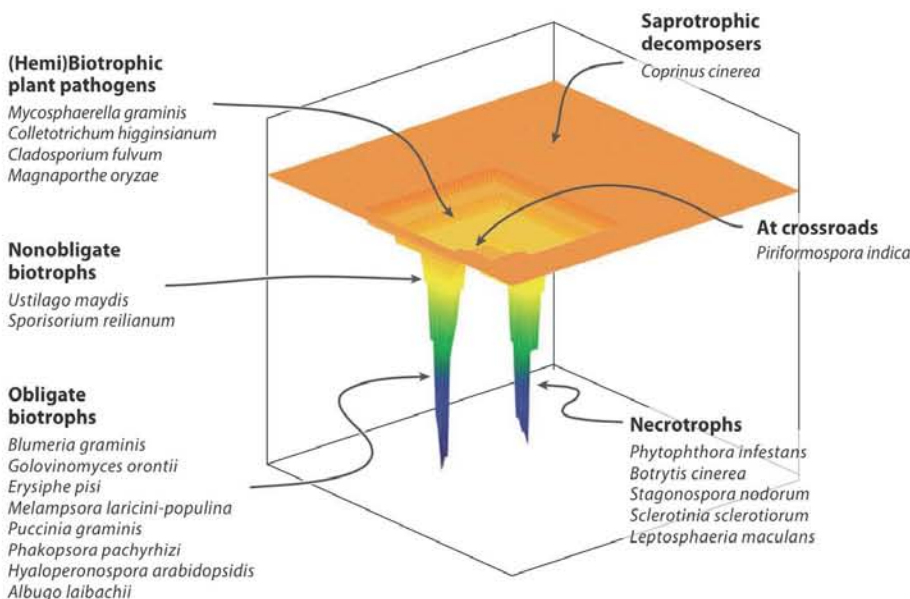
Straménopiles (en orange) et Opisthocontes (en bleu) ont divergé très tôt durant l'évolution. Ils ont donné respectivement les oomycètes et les champignons, au sein desquels certaines espèces présentent un mode de vie parasitique biotrophe telles que les agents des rouilles blanches (white rust) et des mildious duveteux (downy mildews) chez les oomycètes et agents des mildious poudreux (powdery mildews) et maladies de rouilles (rusts) chez les champignons. Différents évènements évolutifs majeurs sont notés par des lettres (de a à g) et replacés sur une échelle de temps à gauche débutant avec le dernier ancêtre commun des eucaryotes LECA (last eukaryotic common ancestor).

Kemen et Jones, *Trends in Plant Science*, 2012

Figure 36. Modèle d'évolution des microorganismes eucaryotes vers la biotrophie et la nécrotrophie

Représentation schématique de l'espace d'adaptation des microorganismes eucaryotes. Les saprotrophes ont développé la capacité de vivre sur la biomasse organique morte. L'évolution des modes de vie biotrophe obligatoire et nécrotrophe constituent des spécialisations ultimes, dont les intermédiaires sont l'hémibiotrophie et la biotrophie non-obligatoire. Dans la figure, *Melampsora laricini-populina* réfère en réalité à *Melampsora laricipopulina*. *Phytophthora infestans* et *Leptosphaeria maculans* sont davantage considérés comme des héli-biotrophes par certains auteurs.

Spanu, *Annual Reviews in Plant Biology*, 2012



toxiques pour les plantes (perte des gènes codant les polyketide synthases ; [Spanu 2012](#)). A l'opposé, certaines familles de gènes encodant des transporteurs d'acides aminés ou de peptides ou encore des effecteurs candidats sont marquées par des expansions et des diversifications importantes. A titre d'exemple, le génome de *M. larici-populina* présente une taille de 101 Mb, ce qui en fait le plus grand génome de basidiomycète séquencé jusqu'à présent, et les éléments transposables représentent près de 45 % du génome ([Duplessis et al., 2011a](#)). Les gènes importants pour l'assimilation de l'azote inorganique ont été perdus, tandis qu'un répertoire de plus d'un millier de gènes codants des petites protéines sécrétées (i.e. effecteurs candidats) a été mis à jour. Enfin, plusieurs familles de transporteurs d'acides aminés et d'oligopeptides sont sur-représentées.

5.3.2 Mécanismes d'évolution des répertoires d'effecteurs candidats

Les récentes comparaisons de nombreux génomes de plusieurs pathovars de *P. syringae* ont permis de révéler combien les répertoires d'effecteurs sont dynamiques et variables chez cette bactérie ([O'Brien et al., 2011](#) ; [Figure 37](#)). La forte plasticité des génomes bactériens a été suspectée comme étant le moteur principal de la diversification des répertoires d'effecteurs. De par la taille plus importante des génomes eucaryotes, ce type d'approche par génomique comparative en est à un stade bien moins avancé chez les champignons ou les oomycètes. Néanmoins, plusieurs analyses d'espèces proches de champignons et d'oomycètes ont été publiées ces deux dernières années, et toutes ont rapporté des répertoires d'effecteurs variables évoluant rapidement ([Dodds 2010](#)). Par exemple, la comparaison de génomes d'espèces proches de *Phytophthora spp.* a révélé des répertoires d'effecteurs hypervariables ([Raffaëlle et al., 2010](#) ; [Figure 38](#)). De manière très comparable aux oomycètes, les génomes de *U. maydis* et *S. reilianum* hébergent des zones divergentes enrichies en gènes codant des facteurs de virulence ([Schirawski et al., 2010](#)). Dans ces deux cas, les gènes d'effecteurs sont présents dans des zones dynamiques du génome, peu denses en gènes mais riches en éléments transposables. Ces régions évolueraient plus rapidement que le reste du génome et ainsi favoriseraient la rapide diversification du répertoire d'effecteurs, par des mécanismes de duplication puis de mutation des gènes, mais aussi par modification de leur structure par insertion ou délétion ([Raffaele et Kamoun 2012](#)). Chez le champignon *L. maculans*, ces zones dynamiques prennent la forme d'isochores spécifiquement enrichis en AT, où les mécanismes d'inactivation des éléments transposables par des mutations RIP

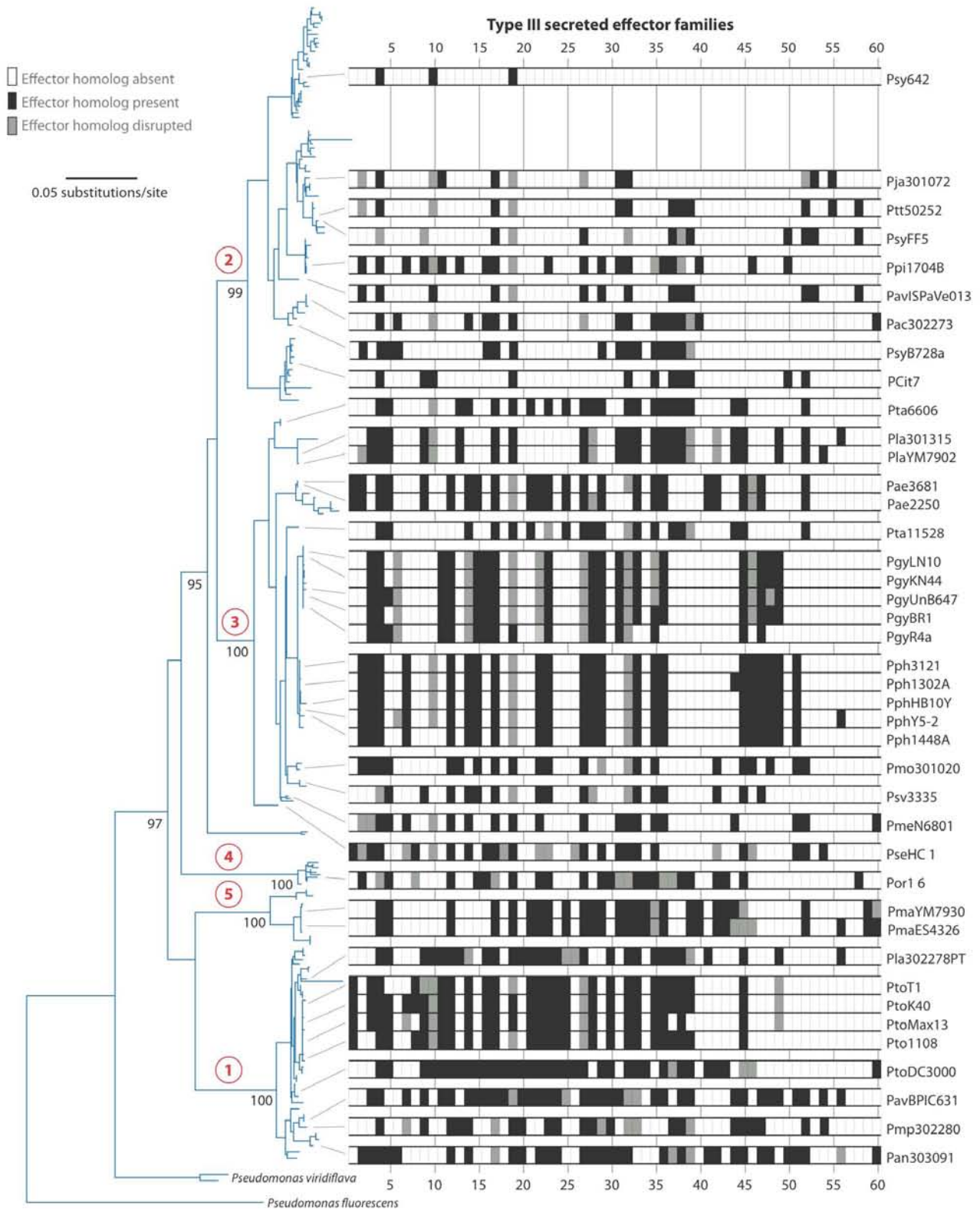


Figure 37. Diversité des répertoires d'effecteurs de type III chez *Pseudomonas syringae*

Le repertoire d'effecteurs de type III identifié au sein des génomes de *Pseudomonas syringae* séquencés est symbolisé en face de l'arbre phylogénétique des *P. syringae*. Les noms des souches sont indiqués à droite. Les chiffres dans les cercles (en rouge) indiquent les différents phylogroupes.

O'Brien et al., Annual Reviews in Plant Biology, 2011

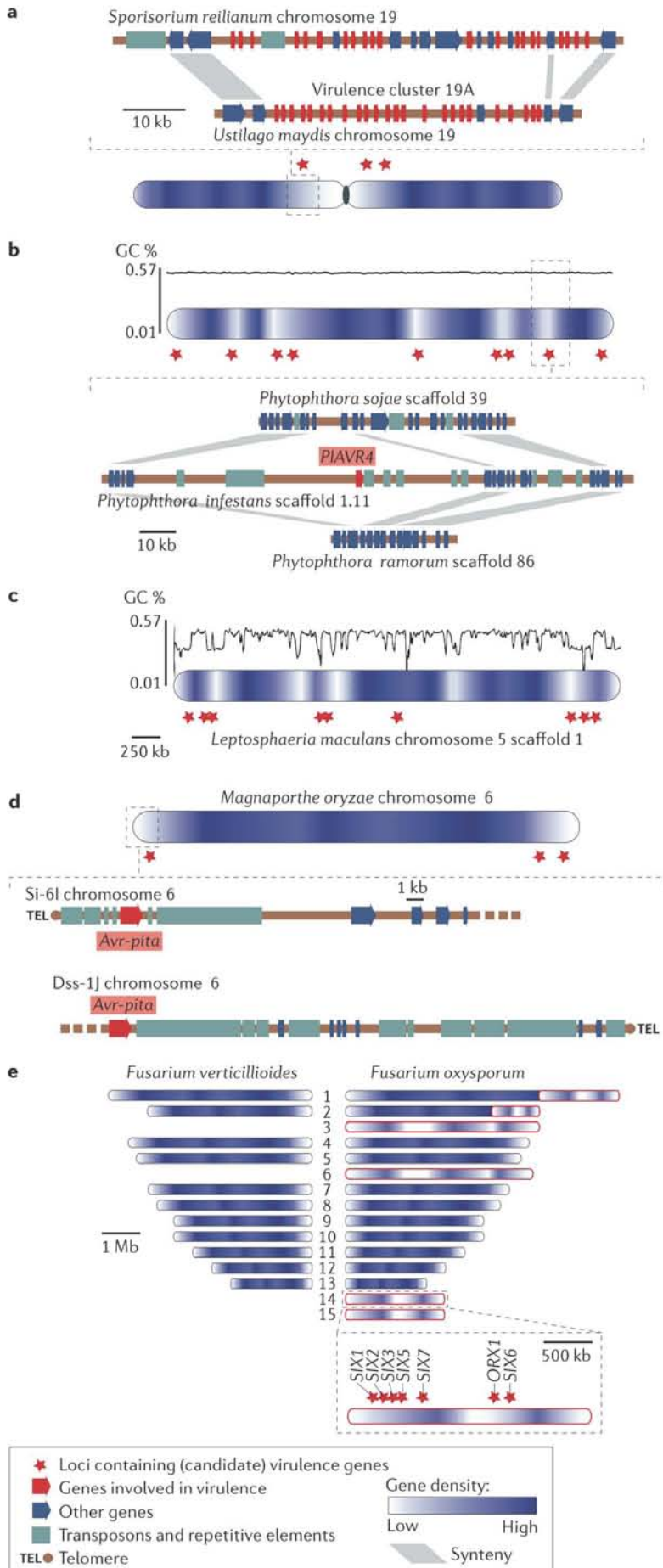


Figure 38. Zones riches en gènes codant des effecteurs au sein des génomes de parasites eucaryotes

a. Les clusters de gènes de virulence chez les basidiomycètes *Sporisorium reilianum* et *Ustilago maydis* sont encodés au sein de zones hypervariables des génomes, riches en éléments transposables. b. Les régions peu denses en gènes chez *Phytophthora spp.* sont riches en éléments transposables et hébergent des effecteurs (par exemple ici la région avec le gène codant le facteur d'avirulence PiAvr4 de *Phytophthora infestans*, très restreinte et sans PiAvr4 chez *P. sojae* et *P. ramorum*). c. Régions riches en AT (isochores) et en éléments transposables chez *Leptosphaeria maculans* qui hébergent des facteurs d'avirulence. d. Le gène codant le facteur d'avirulence Avr-Pita de *Magnaporthe oryzae* est situé dans les régions sub-téломériques riches en éléments transposables. e. Les chromosomes porteurs de gènes de virulence sont présents chez l'espèce pathogène *Fusarium oxysporum* mais absents chez l'espèce non-pathogène *F. verticillioides*.

Raffaele et Kamoun, *Nature Reviews in Microbiology*, 2012

(repeat induced point mutation) semblent favoriser le polymorphisme de séquence et la diversification des effecteurs (Rouxel *et al.*, 2011). Trois ascomycètes responsables des mildious poudreux (les érisiphales) ne présentent quasiment aucun effecteur en commun parmi des répertoires de plusieurs centaines de membres (Spanu *et al.*, 2010). De même, les génomes des basidiomycètes agents de maladies des rouilles *M. larici-populina* et *P. graminis* f. sp. *tritici* présentent d'importants répertoires d'effecteurs candidats très divergents (Duplessis *et al.*, 2011a). Contrairement aux exemples précédents, aucune structuration génomique particulière n'a été observée au sein des génomes permettant d'expliquer une telle diversité de répertoires d'effecteurs candidats. Très récemment, la comparaison de trois génomes de *M. oryzae* a permis d'observer un nombre important de gènes codant des protéines sécrétées de fonction inconnue interrompus par des éléments transposables (Xue *et al.*, 2012). Un autre mécanisme permettant de moduler un répertoire d'effecteur est le gain de nouveaux gènes lors de la reproduction sexuée ou par transfert horizontal. Chez *Fusarium* spp., les gènes codant des facteurs de virulence sont positionnés sur des chromosomes de virulence mobile, qui peuvent rendre virulente une souche non-virulente par transfert de ces chromosomes (Ma *et al.*, 2010). Chez *M. oryzae*, la localisation de certains effecteurs dans les régions sub-télomériques des chromosomes semble permettre des événements de perte ou acquisition rapides en réponse à la présence des résistances dans les cultures (Chuma *et al.*, 2011). Le transfert horizontal de gènes codant des facteurs de virulence est également un mécanisme qui peut permettre à une espèce non-virulente de devenir virulente, comme cela a été démontré avec le transfert du gène codant ToxA depuis *Stagonospora nodurum* vers *Pyrenophora tritici-repentis* (Friesen *et al.*, 2006). Récemment, il a été observé qu'une part importante du sécrétome de *P. ramorum* aurait été acquise par transfert horizontal de gènes fongiques, suggérant ainsi que l'évolution vers le parasitisme chez les oomycètes pourrait avoir été favorisée par l'incorporation de gènes fongiques (Richard *et al.*, 2011). Quelques soient les mécanismes de diversification des répertoires d'effecteurs à l'échelle d'un génome, la reproduction sexuée permet de générer de nouvelles combinaisons d'effecteurs et donc de favoriser la modularité des répertoires (Schulze-Lefert et Panstruga 2011).

5.4. Les effecteurs qui déterminent le spectre d'hôte

Pendant longtemps, la résistance non-hôte a été considérée comme reposant sur des mécanismes non-inductibles, liés à l'inaptitude intrinsèque d'un parasite à germer ou à

pénétrer dans des tissus. Le riz n'est pas un hôte pour les champignons des rouilles comme par exemple *Puccinia* spp. Or, il a été montré récemment que ces champignons sont capables de germer, de pénétrer et de différencier plusieurs dizaines d'haustoria au sein de feuilles de riz (Ayliffe *et al.*, 2011). Cette observation supporte l'idée que les *Puccinia* spp. peuvent infecter de manière importante une plante non-hôte et, considérant l'étendue de certaines infections, former des haustoria fonctionnels et détourner des nutriments des cellules. On sait aujourd'hui que la résistance non-hôte est déterminée dans certains cas par des mécanismes de défense inductibles (Lipka *et al.*, 2008). Par exemple, l'effecteur HopQ1-1 de *P. syringae* pv. *tomato* déclenche l'ETI chez l'espèce non-hôte *Nicotiana benthaminana*, et les bactéries n'exprimant plus cet effecteur peuvent contourner la résistance non-hôte et devenir virulente sur cette plante (Wei *et al.*, 2007). L'effecteur Avr1-CO39 de *M. oryzae* est reconnu chez le riz par la protéine de résistance Pi-CO39. La perte d'Avr1-CO39 a vraisemblablement permis à *M. oryzae* f. sp. *oryzae* d'étendre son spectre d'hôte depuis le millet vers le riz (Couch *et al.*, 2002). Ces observations montrent que l'ETI, et par extension les effecteurs, peuvent être des déterminants moléculaires de la résistance non-hôte et donc du spectre d'hôte d'un parasite donné. Schulze-Lefert et Panstruga ont récemment proposé un modèle permettant de connecter à l'échelle moléculaire résistance non-hôte, PTI/ETI et effecteurs, en stipulant que la contribution de l'ETI et du PTI à la résistance non-hôte d'une plante à un parasite est fonction de la distance phylogénétique entre cette plante et la plante hôte (Figure 39A ; Schulze-Lefert et Panstruga 2011). L'observation que la probabilité qu'un champignon parasite infecte une plante dans un habitat diminue en fonction de la distance phylogénétique entre cette plante et son hôte supporte ce modèle (Gilbert et Webb 2007). Dans le futur, il sera intéressant de considérer à quel point les répertoires d'effecteurs déterminent l'évolution des spectres d'hôtes d'un parasite, aussi bien lors de l'expansion du spectre que lors d'un saut d'hôte.

A l'échelle macro-évolutive, les espèces de plantes ont une certaine probabilité de s'éteindre. De fait, un parasite strictement et uniquement adapté à son hôte s'éteindrait simultanément avec lui (Figure 39B ; Raffaele et Kamoun 2012). Le succès évolutif des parasites adaptés s'explique donc par leur capacité à changer régulièrement d'hôte par extension de leur spectre d'hôte (ou saut d'hôte). La flexibilité des génomes et notamment celle des répertoires d'effecteurs étant la clef de ces adaptations rapides, cette hypothèse expliquerait la persistance de ces caractéristiques au sein des génomes

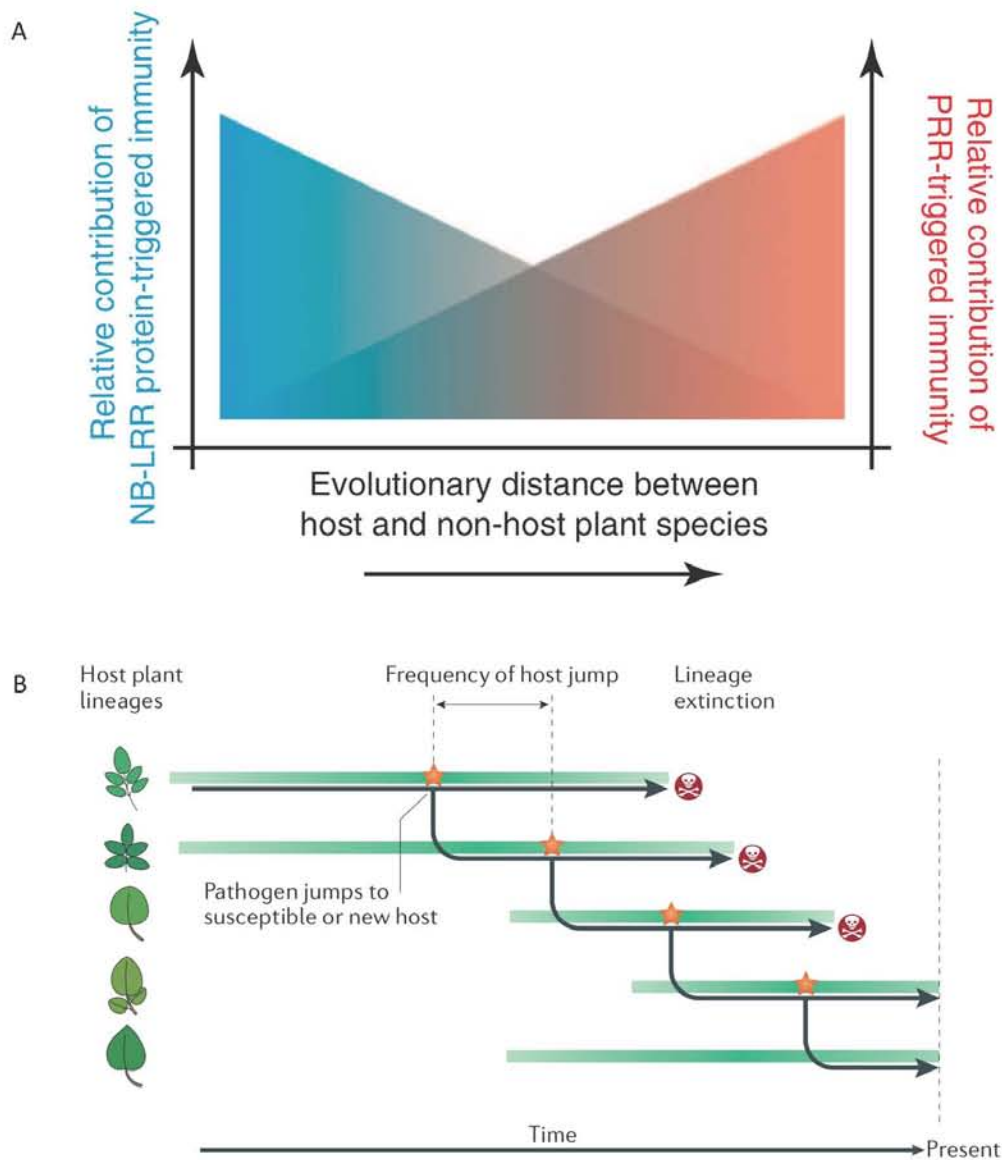


Figure 39. Résistance non-hôte et persistance macro-évolutive des parasites

(A) Modèle de la contribution relative de l'ETI et du PTI à la résistance non-hôte. Plus la distance évolutive entre l'espèce hôte et l'espèce non-hôte est grande, plus la contribution de l'ETI à la résistance non-hôte diminue et celle du PTI augmente. (B) A l'échelle de la macro-évolution, des espèces de plantes s'éteignent, mais les parasites adaptés persistent s'ils sont capables de changer d'hôtes fréquemment.

Schulze-Lefert et Panstruga, Trends in Plant Science, 2011 / Raffaele et Kamoun, Nature Reviews in Microbiology, 2012

Chapitre I

de parasites aujourd'hui. De manière intéressante, la spécialisation sur un nouvel hôte entraîne une co-spéciation avec cet hôte. Dans le cas des champignons hétérothalliques, la colonisation d'un hôte par un seul type sexuel nécessite de retourner sur l'hôte d'origine pour la phase de reproduction sexuée (Schulze-Lefert et Panstruga 2011). Dans le cas de *M. larici-populina* par exemple, cela implique que le mélèze serait l'hôte d'origine et que le cycle végétatif sur peuplier est la conséquence d'un saut d'hôte. Considérant que les effecteurs déterminent le spectre d'hôte, on pourrait s'attendre dans le cas de *M. larici-populina* où les deux hôtes sont fortement divergents à des répertoires d'effecteurs distincts spécifiques à chaque espèce.

PARTIE III : L'INTERACTION PEUPLIER – MELAMPSORA LARICI-POPULINA

1. Le peuplier : un arbre d'intérêt agronomique et un arbre modèle

Le peuplier est une espèce endémique en France faisant partie des écosystèmes ripariaux. Il est aussi utilisé en populiculture pour la production de bois. Etant un des arbres les plus faciles à manipuler en laboratoire, il est devenu une espèce modèle de référence en biologie forestière.

1.1. Le genre *Populus*

Le genre *Populus* regroupe ce que l'on appelle communément les peupliers et les trembles. Il constitue avec le genre *Salix* (les saules) la famille des Salicacées. Les peupliers sont des espèces à croissance rapide, avec un feuillage caduque à feuilles simples. Ils sont dioïques, les fleurs prennent la forme de chatons et leurs graines cotonneuses sont dispersées par le vent. Ils poussent rapidement sur terrain humide, typiquement au sein des ripisylves sur les continents européen, nord-américain et asiatique. Au sein du genre *Populus*, on compte 29 espèces de peupliers, réparties dans six sections, auxquelles il faut ajouter des hybrides naturels ou résultants de croisements réalisés par l'homme (Figure 40 ; Eckenwalder 1996). Trois espèces sont endémiques en France : le peuplier blanc (*Populus alba*), le peuplier noir (*Populus nigra*) et le tremble (*Populus tremula*).

1.2. La populiculture et le cultivar Beaupré

En volume, le peuplier est la 2^{ème} essence feuillue récoltée en France, derrière le chêne. En général, des hybrides interaméricains (par exemple *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) ou euraméricains (par exemple, *P. deltoides* x *Populus nigra*) sont cultivés dans les peupleraies (Figure 41). Les grumes sont récoltées après 15-20 ans pour la production de bois de déroulage utilisable dans l'industrie de la confection de panneaux de bois, d'emballages légers et de contre-plaqués. L'utilisation du peuplier pour la production de bois énergie est de plus en plus envisagée, selon des méthodes de culture en taillis à courtes rotations de cinq à huit années. Au-delà de la production de bois de chauffage, le peuplier fait actuellement l'objet de recherches pour introduire sa biomasse dans les processus de production de biocarburants (Rubin 2008 ; www.energypoplar.eu). En France, la principale limitation à la populiculture vient des épidémies annuelles de rouille foliaire. Cette maladie se caractérise par l'apparition de

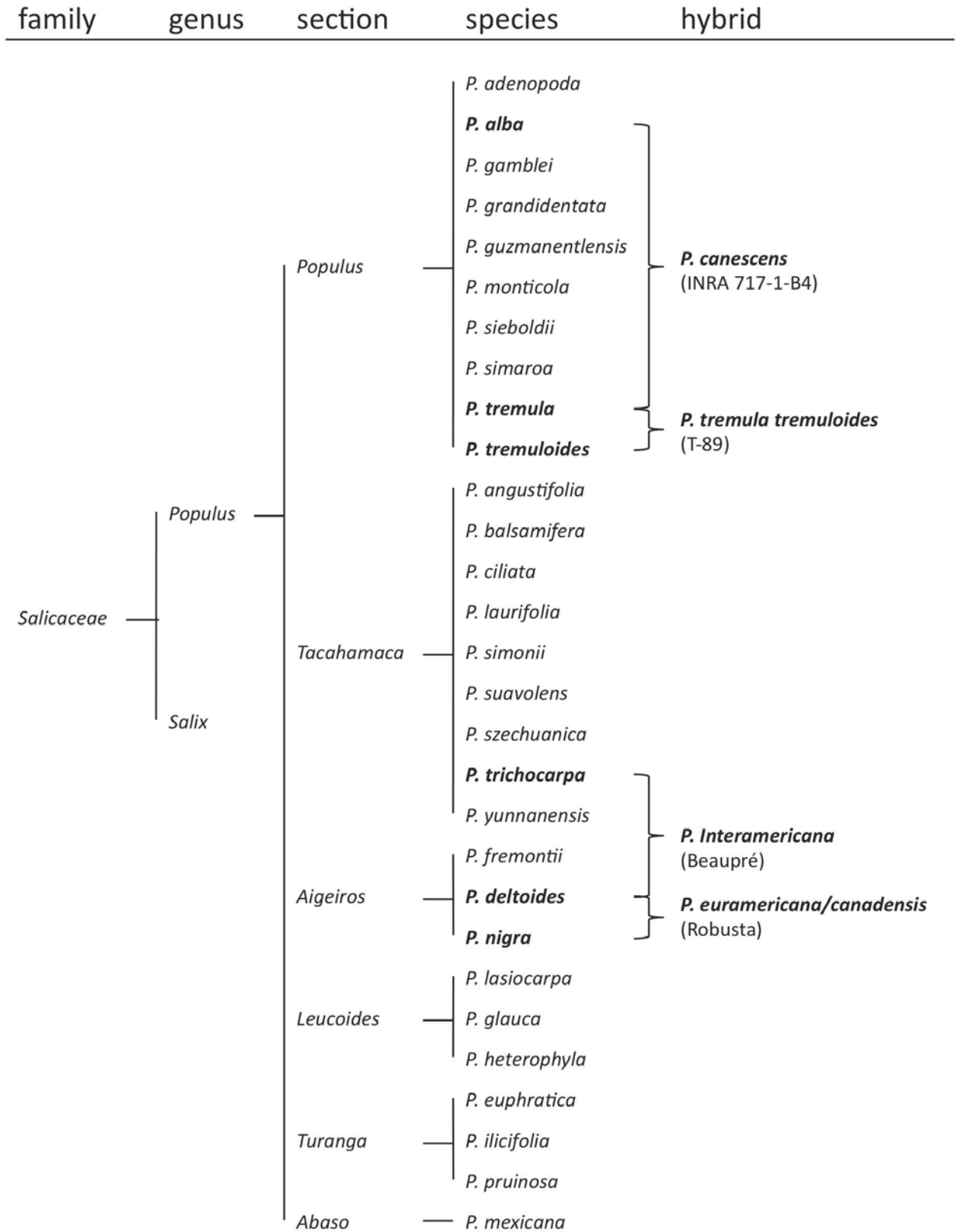


Figure 40. Classification du genre *Populus*

La famille des *Salicacées* comporte les genre *Salix* et *Populus*. Le genre *Populus* est divisé en 6 sections et 29 espèces. Les quelques hybrides les plus utilisés en recherche et en populiculture sont représentés.

Adapté de Rigal, thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, 2010

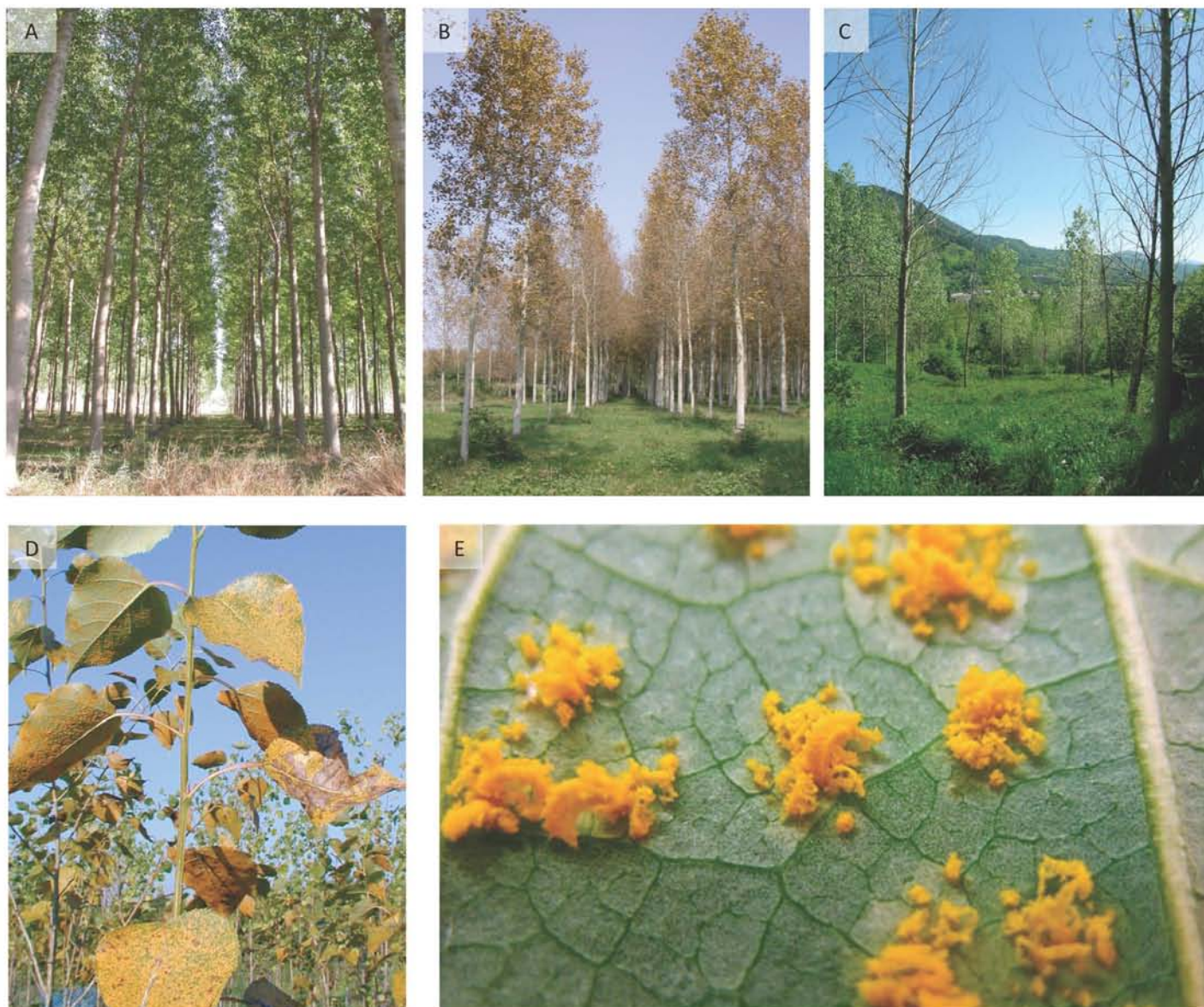


Figure 41. La populiculture et la maladie de la rouille foliaire du peuplier

Peupliers plantés dans une peupleraie non-infectée (A) et dans une peupleraie infectée (B) par la maladie de la rouille foliaire. (C) Peupleraie ayant subi des épidémies répétées de rouille et dont les arbres ont dépéri. (D) Plant de peuplier infecté par la rouille en pépinière à Nancy. (E) Urédies de *Melampsora larici-populina* (symptômes) formées sur une feuille de peuplier (cultivar Beaupré) après infection contrôlée réalisée au laboratoire.

Adapté de Hacquard, thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, 2010 / photos P. Frey, J. Pinon, B. Petre.

pustules orangées sur les feuilles, ce qui confère une couleur rouille aux houppiers infectés. Les épidémies répétées limitent la croissance des arbres et entraînent de manière ultime leur mort. Treize espèces du genre *Melampsora* infectent le peuplier, dont seulement trois touchent les peupleraies en France : *Melampsora medusae*, *Melampsora alli-populina* et *M. larici-populina* (Pinon et Frey 2005 ; Bresson 2011). Les deux premières sont ultra-minoritaires et confinées dans le sud de la France ; *M. larici-populina* étant quant à lui responsable de la quasi-totalité des infections sur le territoire. Toutes les résistances sélectionnées par les améliorateurs et déployées au champ ont été contournées par le champignon, ce qui fait que presque tous les cultivars plantés aujourd'hui sont sensibles à *M. larici-populina*. En effet le statut pérenne des arbres implique que les résistances qualitatives doivent se maintenir au minimum 20 ans dans les plantations monoclonales. L'utilisation de clones semblables dans toute la France a créé une forte pression de sélection contre les résistances des peupliers et a favorisé les contournements de ces résistances et l'émergence de nouvelles virulences dans les populations du pathogène, qui ont des effets dévastateurs sur les cultures. Par exemple, le cultivar Beaupré (hybride *P. trichocarpa* x *P. deltoides*) est porteur de la résistance 7. Jusqu'à 50 % des peupliers plantés en France dans les années 1990 étaient des cultivars Beaupré. En 1994, des souches de *M. larici-populina* porteuses de la virulence 7 (i.e. contournement de la résistance 7) sont apparues et ont infecté l'ensemble des peupleraies de France en quelques années, diminuant les rendements des cultivars Beaupré et rendant leur culture non rentable (Pinon et Frey 2005 ; Xhaard *et al.*, 2012).

1.3. Le peuplier : un arbre modèle

Le peuplier pousse vite, présente une forte diversité d'espèces, s'hybride facilement, est transformable, se propage de manière végétative et fleurit en quelques années seulement (Brunner *et al.*, 2004). Ces caractéristiques en ont fait un arbre modèle en laboratoire. En 2006, le génome de *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' a été le premier génome d'arbre séquencé et analysé (Tuskan *et al.*, 2006). La disponibilité de la séquence génomique, ainsi que les outils bioinformatiques associés tels les portails du Phytozome (Joint Genome Institute ; département de l'énergie américain) et PopGenie (Sjodin *et al.*, 2009) ont permis d'accélérer les recherches en génomique fonctionnelle (Yang *et al.*, 2009). La communauté scientifique s'est concentrée sur des aspects physiologiques spécifiques au peuplier par rapport aux plantes annuelles modèles comme arabidopsis. En particulier, les mécanismes développementaux liés au mode de vie pérenne mais

aussi la production de bois et la régulation de la croissance ont été étudiés. L'interaction du peuplier avec *M. larici-populina* a servi de pathosystème modèle pour décrire la régulation des gènes de défense lors de la mise en place des mécanismes de résistance (Rinaldi *et al.*, 2007 ; Duplessis *et al.*, 2009). La comparaison des interactions incompatible et compatible chez le cultivar Beaupré a notamment permis de dresser des listes de gènes dont l'expression est induite durant la résistance à *M. larici-populina*, parmi lesquelles figurent notamment beaucoup de protéines PR, d'enzymes du métabolisme secondaire ou d'enzymes impliquées dans les mécanismes de régulation redox (Figure 42). Cela a révélé une forte similarité entre les programmes de défense du peuplier et des plantes annuelles, bien que certaines spécificités comme l'expression de la protéine Risp (rust-induced secreted protein) existent (Rinaldi *et al.*, 2007).

2. Les Pucciniales

2.1. Mode de vie et structures d'infection

Les Pucciniales forment un ordre de champignons basidiomycètes d'une quinzaine de familles comportant plusieurs milliers d'espèces, qui adoptent un mode de vie parasitique biotrophe obligatoire. Ils infectent collectivement la plupart des organes aériens des plantes terrestres, mais chaque espèce présente généralement un spectre d'hôte assez restreint (Voegelé *et al.*, 2009). Leur cycle biologique peut être micro- ou macro-cyclique et impliquer un deuxième hôte pour la phase de reproduction sexuée. Les infections qu'ils génèrent sont diverses, mais commencent en général par la germination d'une spore à la surface d'un organe (une feuille par exemple), suivi de la pénétration dans les tissus, puis la ramification de nombreux hyphes d'infection qui invaginent des haustoria dans les cellules hôtes (Figure 42). Ces structures servent à sécréter des effecteurs dans les tissus infectés et à dériver des nutriments de l'hôte (Voegelé *et al.*, 2009 ; Rafiqi *et al.*, 2012 ; Duplessis *et al.*, 2012). Après un certain temps, le champignon envahit complètement les tissus et libère des spores en formant des pustules allant du noir au jaune à la surface des organes infectés. Ces pustules sont les symptômes des maladies dites des rouilles ; les Pucciniales sont communément appelées 'rouilles' ou agents des rouilles.

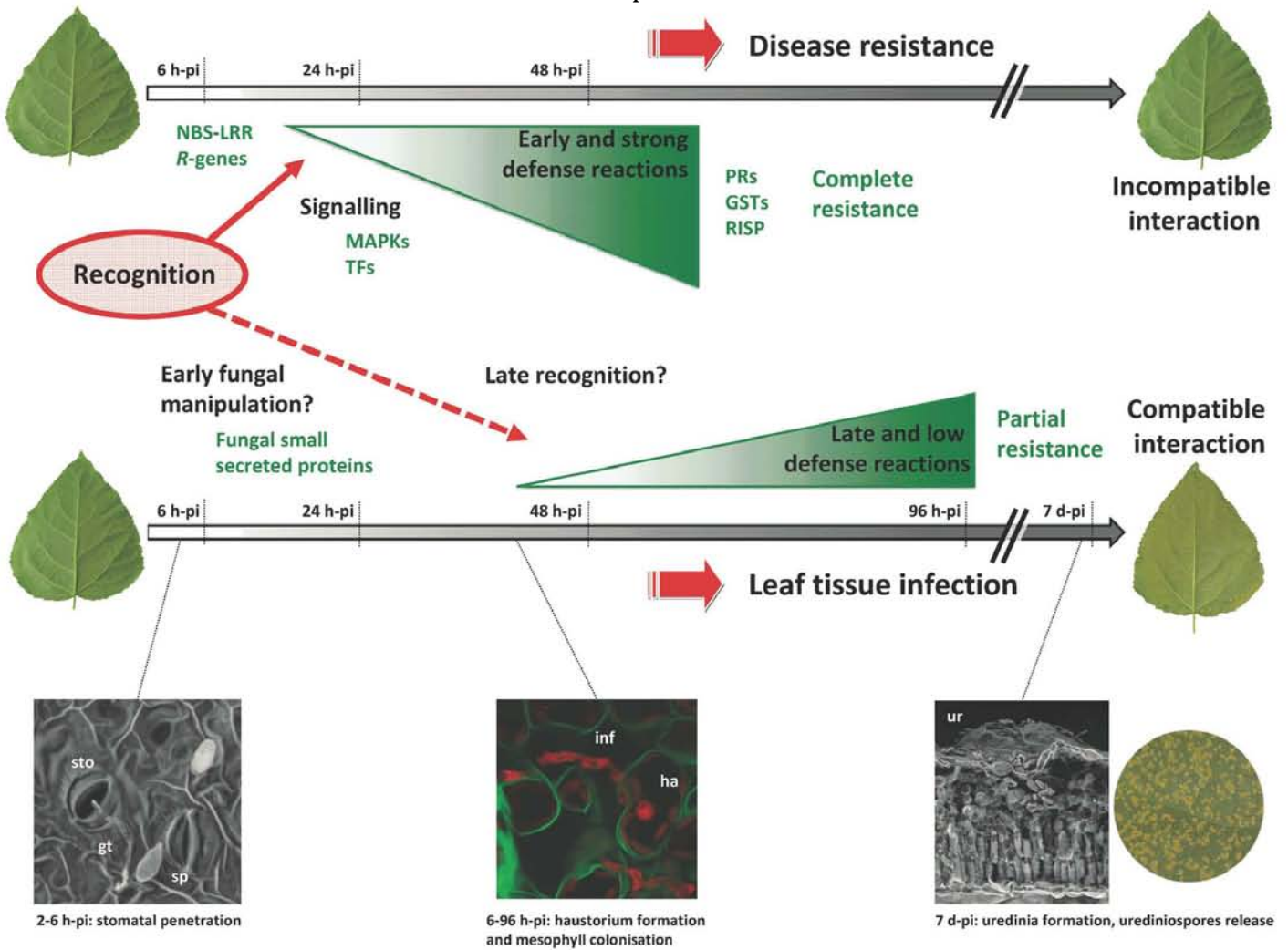


Figure 42. Modèle décrivant les réponses de défense du peuplier à *Melampsora larici-populina* et les principales étapes d'infection des tissus foliaires

Représentation des interactions incompatible et compatible entre le cultivar Beaupré de peuplier et *M. larici-populina*. Dans les deux types d'interaction, en moins de 6 heures post-inoculation (hpi) une spore germe à la surface d'une feuille et émet un tube germinatif qui va pénétrer dans la feuille via un stomate suite à la formation d'un appressorium. Avant 24 heures, des hyphes d'infection et des haustoria sont différenciés *in planta*. Lors de l'interaction incompatible, la progression du champignon dans les tissus est stoppée vers 48 hpi, vraisemblablement via une reconnaissance de type R-Avr suivie d'une signalisation et à la mise en place de réponses de défense impliquant entre autres des protéines PR, des GST (glutathion-S transférase) et la protéine Risp (rust-induced secreted protein) et une réponse hypersensible hyperlocalisée. Lors d'une interaction compatible, le champignon entame une croissance biotrophe continue qui aboutira, 7 jours après inoculation, à un très fort envahissement des tissus foliaires et à la sporulation. Dans cette situation, des mécanismes menant à une résistance partielle peuvent être mis en place. Duplessis et al., *Critical Reviews in Plant Science*, 2009

2.2. Maladies des rouilles : symptômes et conséquences sur les cultures

Les Pucciniales causent les maladies des rouilles sur un grand nombre de plantes, générant des symptômes divers et parfois spectaculaires (Figure 1 et 43). Par exemple, *P. monoica* infecte son hôte de manière systémique et modifie complètement son développement en induisant des pseudo-fleurs. D'autres agents modifient les structures des organes infectés comme *Gymnosporangium juniperi-virginianae* avec ses formes de vers orangés sur le cèdre, *Puccinia urticata* et ses pustules sur les orties ou encore *Ravelenia spp.* qui génère des structures en forme de boursouflures grises sur les acacias. *Cronartium ribicola* cause la rouille vésiculeuse du pin qui se caractérise par des pustules sur le tronc des arbres, *Triphragmium ulmariae* et *Phragmidium tuberculatum* forment leurs pustules sur les tiges et les nervures respectivement de la reine des prés et des rosiers. Cependant, les maladies des rouilles touchent majoritairement les feuilles sur lesquelles elles forment des pustules caractéristiques allant du noir au jaune, qui peuvent être isolées (*Pileolaria terebinthi*, *P. pachyrhizi*, *P. graminis*) ou regroupées en taches de pustules (*Hemileia vastatrix*, *Puccinosira pallidula*). Les maladies des rouilles touchent de manière problématique les plantes cultivées par l'homme (Figure 44). Par exemple, les rouilles jaunes, brunes et noires du blé causées respectivement par *P. striiformis* f. sp. *tritici*, *P. triticina* et *P. graminis* f. sp. *tritici* entraînent des pertes importantes dans les cultures de blé (Dean et al., 2012). Depuis la fin des années 1990, la lignée de souches hypervirulentes Ug99 de *P. graminis* f. sp. *tritici* se disperse depuis l'Afrique de l'est vers le Moyen-Orient et l'Asie. Ces souches infectent la quasi-totalité des cultivars de blé actuellement utilisés, menacent la production mondiale de blé et par là même l'approvisionnement en nourriture de nombreux pays (Singh et al., 2011). D'autre part, la production de soja au Brésil est limitée par les épidémies du champignon causant la rouille asiatique *P. pachyrhizi* (Goellner et al., 2010). Récemment, un classement des 10 champignons phytopathogènes les plus étudiés au niveau moléculaire a inclus les trois rouilles du blé ainsi que l'agent de la rouille du lin *Melampsora lini*, qui est l'un des modèles les plus avancés dans le domaine des interactions moléculaires plantes-parasites (Dean et al., 2012). En outre, quelques autres pathosystèmes impliquant des rouilles sont étudiés au niveau moléculaire comme féverole-*U. fabae*, haricot-*Uromyces appendiculatus*, pin-*Cronartium ribicola* et caféier-*Hemileia vastatrix*.

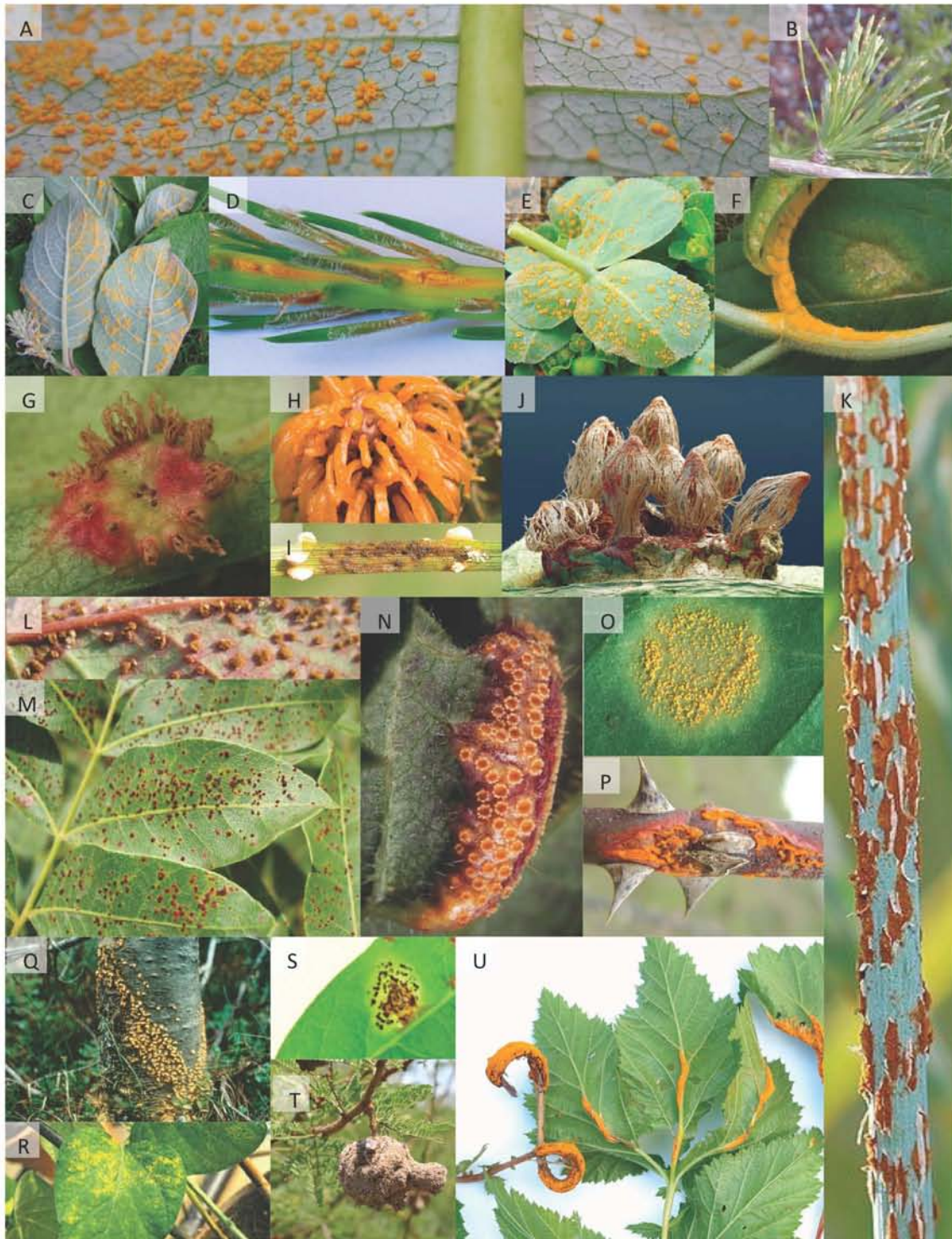


Figure 43. Les Pucciniales sur leurs hôtes

(A) *Melampsora larici-populina*/peuplier. (B) *M. larici-populina*/mélèze. (C) *Melampsora salicina*/saule. (D) *Melampsora pinitorqua*/pin. (E) *Melampsora ricinus*/ricin. (F) *Melampsora rostrupii*/mercuriale. (G) *Gymnosporangium clavariiforme*/aubépine. (H) *Gymnosporangium juniperi-virginianae*/cèdre. (I) *Coleosporium tussilanigis*/pin. (J) *Gymnosporangium sabiniae*/poirier. (K) *Puccinia graminis*/blé. (L) *Cumminsella mirabilissima*/mahonia. (M) *Pileolaria terebinthi*/pistachier térébinthe. (N) *Puccinia urticata*/ortie. (O) *Hemileia vastatrix*/caféier. (P) *Phragmidium tuberculatum*/rosier. (Q) *Cronartium ribicola*/pin. (R) *Phakopsora pachyrhizi*/soja. (S) *Puccinosira pallidula*/herbe à poux. (T) *Ravelenia* spp./acacia. (U) *Triphragmium ulmariae*/reine des près.

B. Petre / P. Frey / www.pilzfotopage.de / www.asturnatura.com / www.wildaboutbritain.co.uk / www.treesforlife.org / www.discovermagazine.com / www.wikipedia.com / www.sciencephoto.com / www.fungiworld.com / www.mycologia.net / www.apsnet.org / www.photofungi.com / www.fitopatologia1.blogspot.fr / www.acacia-world.net / www.champignon.moselle.free.fr.



Figure 44. Les maladies des rouilles dans les cultures

(A) Parcelles de blé avec des plants susceptibles à différents agents des rouilles au milieu de parcelles avec des plants de blé résistants. (B) Lignes de plants de soja résistants (à gauche) et sensibles (à droite) à *Phakopsora pachyrizhi*, agent de la rouille asiatique du soja. (C) Champs d'avoine résistant (à gauche) et sensible (à droite) à *Puccinia coronata*.

www.aces.nmsu.edu/leaf/ / www.apsnet.org / www.fao.org

2.3. Le genre *Melampsora* et *Melampsora lini*

La famille des *Melampsoraceae* compte uniquement le genre *Melampsora*, lui-même composé d'environ 90 espèces. Notamment, le pathosystème lin-*M. lini* a permis de réaliser des avancées significatives sur les effecteurs des rouilles et des parasites biotrophes en général (Ellis *et al.*, 2007). Quatre facteurs d'avirulence (AvrL567, AvrM, AvrP123, AvrP4) ont été identifiés au sein de ce système, ainsi que les gènes de résistance correspondants (Tableau 4). A ce jour, les quatre facteurs d'avirulence de *M. lini* sont les seuls effecteurs clairement établis chez les rouilles, bien que deux facteurs d'avirulence semblent avoir été identifiés récemment chez *P. graminis* (Nirmala *et al.*, 2010, 2011). Chez *M. lini*, l'expression et sécrétion de certains effecteurs par le biais des haustoria ont été démontrées, de même que leur capacité à être internalisé par les cellules végétales en absence du champignon (Dodds *et al.*, 2004 ; Catanzariti *et al.*, 2006 ; Rafiqi *et al.*, 2010, Rafiqi *et al.*, 2012). L'évolution de ces effecteurs sous pression de sélection positive a été vraisemblablement imposée par l'interaction physique avec leurs protéines de résistance associées (Dodds *et al.*, 2006, Van Der Merwe *et al.*, 2009 ; Ravensdale *et al.*, 2011). Les analyses d'AvrL567 et d'AvrM constituent les premières études structure/fonction d'effecteurs de rouilles, qui ont permis entre autres de définir les zones importantes pour l'internalisation dans les cellules hôtes et la reconnaissance par les protéines de résistance (Wang *et al.*, 2007 ; Catanzariti *et al.*, 2010). Enfin, la transformation du champignon a permis de démontrer au sein du pathosystème la fonction d'avirulence d'AvrL567, et ouvre des perspectives pour l'analyse fonctionnelle des effecteurs dans ce pathosystème (Lawrence *et al.*, 2009). A ce jour, RTP1 d'*U. fabae* et les quatre facteurs d'avirulence de *M. lini* sont les seuls effecteurs de Pucciniales identifiés. Aucune activité de virulence ou d'avirulence n'a été observée pour RTP1, mais très récemment une fonction d'inhibiteur de protéase a été proposée (Pretsch *et al.*, 2012). D'une manière générale, aucune fonction de virulence, aucune cible de virulence et aucune activité biochimique n'a été publiée concernant les effecteurs de rouilles (Duplessis *et al.*, 2012). Outre *M. lini*, les *Melampsoraceae* (et leurs hôtes principaux) les mieux décrits sont *M. larici-populina*, *M. medusae* et *M. allii-populina* (peuplier), *Melampsora ricinus* (ricin), *Melampsora pinitorqua* et *Melampsora occidentalis* (pin), *Melampsora salicina* (saule) et *Melampsora epitea* (conifères, saules) (Figure 43).

3. L'interaction peuplier-*M. larici-populina*

Cette sous-partie est constituée d'un article de synthèse rédigé en anglais et intitulé '**The Poplar-Poplar Rust Interaction: Insights from Genomics and Transcriptomics**' accepté le 28 juin 2011 pour publication dans la revue *Journal of Pathogens*. Je suis co-premier auteur de cet article avec Stéphane Hacquard, doctorant ayant réalisé sa thèse au sein de l'UMR IAM entre 2007 et 2010 sur l'analyse du sécrétome et du transcriptome de *M. larici-populina*. Dans le cadre de cet article, nous avons tenté de dresser un portrait exhaustif des connaissances actuelles du pathosystème peuplier-*M. larici-populina*.

Chapitre I

Chapitre I

Article n° 1 : The Poplar-Poplar Rust Interaction: Insights from Genomics and Transcriptomics

Stéphane Hacquard, **Benjamin Petre**, Pascal Frey, Arnaud Hecker, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

Article publié le 28 juin 2011 dans la revue 'Journal of Pathogens'
doi:10.4061/2011/716041

<http://www.hindawi.com/journals/jpath/2011/716041/>

Review Article

The Poplar-Poplar Rust Interaction: Insights from Genomics and Transcriptomics

Stéphane Hacquard, Benjamin Petre, Pascal Frey, Arnaud Hecker, Nicolas Rouhier, and Sébastien Duplessis

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Nancy Université, Unité Mixte de Recherche 1136, "Interactions Arbres/Micro-organismes," Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

Correspondence should be addressed to Sébastien Duplessis, duplessi@nancy.inra.fr

Received 6 April 2011; Accepted 28 June 2011

Academic Editor: Brett Tyler

Copyright © 2011 Stéphane Hacquard et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Poplars are extensively cultivated worldwide, and their susceptibility to the leaf rust fungus *Melampsora larici-populina* leads to considerable damages in plantations. Despite a good knowledge of the poplar rust life cycle, and particularly the epidemics on poplar, the perennial status of the plant host and the obligate biotrophic lifestyle of the rust fungus are bottlenecks for molecular investigations. Following the completion of both *M. larici-populina* and *Populus trichocarpa* genome sequences, gene families involved in poplar resistance or in rust fungus virulence were investigated, allowing the identification of key genetic determinants likely controlling the outcome of the interaction. Specific expansions of resistance and defense-related genes in poplar indicate probable innovations in perennial species in relation with host-pathogen interactions. The genome of *M. Larici-populina* contains a strikingly high number of genes encoding small secreted proteins (SSPs) representing hundreds of candidate effectors. Transcriptome analyses of interacting partners in compatible and incompatible interactions revealed conserved set of genes involved in poplar defense reactions as well as timely regulated expression of SSP transcripts during host tissues colonisation. Ongoing functional studies of selected candidate effectors will be achieved mainly on the basis of recombinant protein purification and subsequent characterisation.

1. The *Populus/Melampsora* Interaction

Poplars are fast growing trees naturally present in riparian forests of the northern hemisphere [1]. Hybrid poplars are extensively cultivated worldwide for wood production and have recently received growing attention for bioenergy research programs [2]. During the last decades, breeders have generated a collection of hybrid poplars with complete resistances to *M. larici-populina*. Nevertheless, culture practices in monoclonal plantations enhanced the rapid breakdown of selected poplar resistances [1]. Nowadays, almost all poplar cultivars are susceptible to the rust fungus, and dramatic damages are observed in plantations [1]. Thus, *M. larici-populina* represents the major threat of poplar in plantations, and it is crucial to identify key determinants controlling the outcome of the poplar-poplar rust interaction in order to define new strategies to contain the disease. In

addition, the study of this pathosystem should also provide new insights into the molecular mechanisms associated with fungal biotrophy and host resistance in perennial plants.

M. larici-populina is a basidiomycete biotroph pathogen belonging to the Pucciniales order (Pucciniomycotina, Pucciniomycetes, Pucciniales, Melampsoraceae). This leaf rust fungus has a complex heteroecious macrocyclic lifestyle; that is, the biological cycle is completed on two different hosts and implies five different spore forms (detailed in Figure 1(a)). In early spring, overwintered diploid teliospores (2n) that have undergone karyogamy and meiosis in ground decaying poplar leaves (telial host) produce haploid basidiospores (n). After dissemination by the wind, these spores achieve a single infection on larch (aecial host) needles leading to the production of pycniospores (n). Fusion of opposite mating types generates aecia and dikaryotic aeciospores (n+n, sexual phase). These wind-borne spores then infect

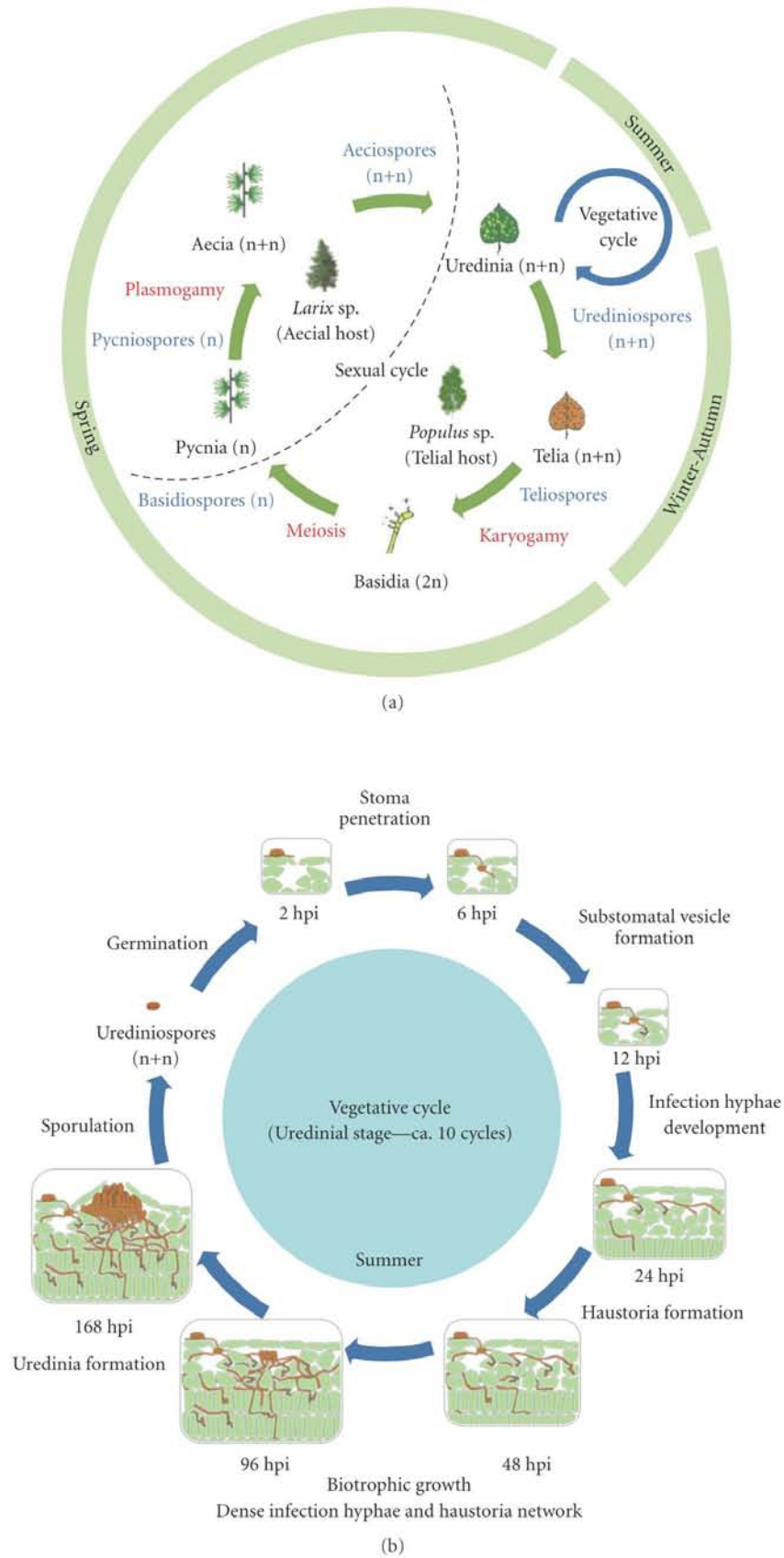


FIGURE 1: Life cycle of *Melampsora larici-populina*. (a) Biological macrocyclic heteroecious cycle of *M. larici-populina*. (b) Vegetative cycle occurring on poplar leaves and used as a model for molecular investigations of the poplar-poplar rust interaction.

poplar leaves and differentiate another sporulation structure called the uredinium, which corresponds to an orange pustule formed on the abaxial epidermis of mature leaves, the typical symptom of the disease on poplar trees. Large amounts of urediniospores (n+n, asexual phase) are released from uredinia and dispersed over very large distances [3, 4]. Several vegetative infection cycles can be completed on poplar leaves during spring and summer. In autumn, black telia pustules containing teliospores (n+n) are produced in senescent poplar leaves.

Since damages observed in poplar plantations occur during the asexual development of the rust fungus (detailed in Figure 1(b)), this specific phase has received attention from several research groups focusing on different aspects of the poplar-poplar rust interaction (for review, see [1, 5]). The major developmental transitions of the fungus (i.e., differentiated infection cell types) have been described by microscopy during colonisation of poplar leaves in controlled experimental conditions [6–9]. First, urediniospores (n+n) germinate on the abaxial surface of poplar leaves and produce germ tubes that penetrate through stomata within the first 6 hours postinoculation (hpi). After 12 hpi, substomatal vesicles are formed in the spongy mesophyll, from which infection hyphae extend into the mesophyll and differentiate the first haustorial structures as soon as 17 hpi [6]. In the case of a compatible interaction, biotrophic growth goes on and the fungal biomass strongly increases between 48 and 96 hpi (i.e., >30-fold) [7, 10], forming a dense network of infection hyphae and haustoria in the mesophyll nearby primary infection sites [7]. Around seven days after inoculation (168 hpi), fungal pressure generates a breach in the abaxial epidermis and leads to the formation of uredinia releasing newly formed urediniospores at the surface of the leaves [7, 9]. In the case of an incompatible interaction, fungal growth is arrested early during the colonisation process, concomitant with strong plant defense reactions [6, 7, 10]. Cytological observations revealed a highly localized hypersensitive response (HR), with collapsed infected plant cells and accumulation of monolignols around infection sites after 48 hpi in the incompatible interaction [6, 7]. At later time points in the compatible interaction, anthocyanidins, lignin, pectin, and hydrogen peroxide accumulate around infection sites and likely participate in late defense responses and partial resistance in poplar [5, 8, 11].

In spite of the efforts initiated to describe this pathosystem, the obligate biotrophic status of *Melampsora* spp., the lack of efficient systems for genetic transformation of hybrid poplars susceptible to the rust fungus, and the long generation time of poplar all together represent a serious bottleneck for molecular investigations. Fortunately, recent advances in tree and fungal genomics have helped in defining new strategies to facilitate the study of this tree-rust fungus model pathosystem. Indeed, the genome sequence of the black cottonwood *Populus trichocarpa* “Nisqually-1” was the first tree genome sequenced by the Joint Genome Institute (JGI, Department of Energy, USA) [12]. As part of a community-sequencing project aiming to decipher lifestyles of poplar microbiome, the genome of *M. larici-populina* (strain 98AG31) has been sequenced by the JGI along with

those of symbiotic fungi interacting with poplar roots [13, 14]. The genome sequence of the poplar rust fungus has been recently released [15].

The availability of both the host and the parasite genome sequences offers unparalleled opportunities to study gene families involved in plant defense and pathogen virulence within an integrated pathosystem [5, 16, 17]. Comparative genomic studies with other plants and biotrophic fungi or oomycetes also help to decipher the evolutionary trends underlying plant-pathogen interactions in perennial plant species [18]. The access to these reference genomes is also a great opportunity to perform transcriptome analyses through the use of whole-genome custom exon oligoarrays or high-throughput sequencing technologies (RNA-Seq).

2. Learning from the Genomes of Poplar and *M. larici-populina*

With the complete genome sequences of *P. trichocarpa* and *M. larici-populina*, performing *in silico* gene family analyses is a critical step to decipher expression, evolution, and biological functions of genes and proteins participating or regulating a wide variety of mechanisms related to plant immunity or fungal pathogenesis.

Genome-wide analyses of poplar gene families previously reported to be related to pathogen response in plants have been summarized in Table 1, taking as a basis a previous report by Yang and collaborators in 2009 [16]. Globally, researches were mostly devoted to the study of functions such as secondary metabolism associated with plant cell wall and wood formation, hormone biosynthesis, transcription factors, signalling pathways, and redox homeostasis (Table 1). Considering the flow of data available, here we essentially focus on analyses performed from the standpoint of the poplar-poplar rust pathosystem. Kohler and collaborators [19] reported in 2008 the genome-wide analysis of poplar genes coding for nucleotide-binding leucine-rich repeat (NB-LRR) proteins, representing a large class of plant resistance genes (*R* genes) responsible for pathogen effector recognition and leading to complete resistance through effector-triggered immunity in many pathosystems [20, 21]. Approximately 400 *NB-LRR* genes were identified in the genome of *P. trichocarpa*, which is twice larger than *NB-LRR* genes reported in *Arabidopsis thaliana* (402 versus 178, resp.). The presence of about 500 *NB-LRR* genes in the rice genome does not support a specific increase of this gene family in perennial species [5]; however, the content in *NB-LRR* gene classes (TIR-NB-LRR and non-TIR-NB-LRR) differs between monocot and dicot genomes [19]. Interestingly, many of the poplar *NB-LRR* genes (more than 70 according to [22]) are gathered into a supercluster localized on the chromosome 19, in the neighbourhood of many transposable elements (retrotransposons). Since retroelements are known to impact gene family increase and diversification, it is tempting to hypothesize that this supercluster is likely a nursery for new poplar *R* genes [23]. Recently, the fine mapping of two rust resistance loci associated with complete resistance and partial resistance to

TABLE 1: Summary of genome-wide studies conducted on disease-related gene families in poplar.

Gene family analyzed	References	Implication in plant defense reactions	References
<i>NB-LRR</i> (nucleotide-binding leucine-rich repeat)	Kohler et al. [19]	Gene-for-gene resistance mechanisms, host-specific resistance (R proteins)	Jones and Dangl [20]
<i>BED-NB-LRR</i> (BED family of poplar NB-LRR)	Kohler et al. [19] Germain and Séguin [24]	BED domain is a zinc-finger DNA-binding domain	Markljung et al. [64]
<i>TLPs</i> or PR5 (thaumatin-like proteins)	Petre et al. [27]	Antimicrobial and glycan-degrading activities	Liu et al. [65]
<i>Phenylpropanoid</i> metabolism (secondary metabolism)	Tsai et al. [66] Hamberger et al. [67]	Phytoalexin synthesis and cell wall reinforcement upon pathogen attack	Bednarek and Osbourn [68]
<i>CAD</i> (cinnamyl alcohol dehydrogenase)	Barakat et al. [69]	Lignin biosynthesis, cell wall reinforcement upon pathogen attack	Tronchet et al. [70]
<i>YUCCA</i> (auxin biosynthesis)	Ye et al. [71]	Auxin can promote virulence during biotrophic infection	Grant and Jones [72]
<i>ARF</i> and <i>Aux/IAA</i> (auxin-response transcription factor)	Kalluri et al. [73]	Auxin can promote virulence during biotrophic infection	Grant and Jones [72]
<i>AP2/ERF</i> (Ethylene-response transcription factors)	Zhuang et al. [74]	Regulation of disease resistance pathways	Gutterson and Reuber [75]
<i>R2R3MYB</i> (transcription factors)	Wilkins et al. [76]	Regulation of secondary metabolism (in Response to pathogen attack)	Mellway et al. [77]
<i>LysM kinase</i> (signal transduction)	Zhang et al. [78]	Chitin signaling and fungal resistance	Wan et al. [79]
<i>PLD</i> (phospholipase D)	Liu et al. [80]	Secondary messenger release upon pathogen attack	Wang [81]
<i>Protease</i> (protein degradation)	Garcia-Lorenzo et al. [82]	(Pathogen) protein degradation, regulation of plant cell death	Solomon et al. [83]
<i>F-box</i> (selective degradation of proteins)	Yang et al. [84]	Pathogen effector targets for host manipulation	Block et al. [85]
<i>Kunitz-trypsin inhibitors</i> (protease inhibition)	Major and Constabel [86]	Inhibition of pathogen protease and pathogen-triggered cell death	Li et al. [87]
<i>RBP</i> (RNA binding proteins)	Peal et al. [88]	Pathogen effector targets for host manipulation	Fu et al. [89]
<i>GST</i> (glutathione transferase)	Lan et al. [90]	Xenobiotic detoxification and redox homeostasis	Dixon et al. [91]
<i>Grx</i> (glutaredoxin)	Couturier et al. [92]	Redox metabolism and homeostasis controlling oxidative burst	Rouhier et al. [93]

M. larici-populina was achieved on the peritelomeric end of the chromosome 19 in the *NB-LRR* genes supercluster, which strongly suggests that rust-related *R* genes belong to the NB-LRR class [22]. In addition to the coiled-coil (CC) and toll-interleukine receptor (TIR) NB-LRR classes, a third class of *NB-LRR* genes containing a BED finger domain (called BED-NB-LRR, henceforth called BNL) has also been reported in the poplar genome [19, 24]. The discovery of the BED domain was first published in 2000 and was termed BED finger, after two *Drosophila* proteins named BEAF and DREF containing this domain [25]. The BED motif corresponds to a ubiquitous zinc-finger DNA-binding domain, raising the possible involvement of such BNL proteins in interaction with DNA and eventually regulation of transcription, although no evidence for such mechanism has been provided yet [24]. Upon recognition of a pathogen, plant R proteins trigger defence response reactions, marked by the strong induction of pathogenesis-related proteins (PR proteins) at the transcript and protein levels [26]. Interestingly, in

addition to the large number of *R* genes, the poplar genome also contains an expanded gene family encoding thaumatin-like proteins (TLPs), corresponding to the PR-5 proteins. This gene family illustrates an overrepresentation of defense-related genes in poplar compared with annual species with 42 genes identified in *P. trichocarpa* versus 22 in the *A. thaliana* genome sequence [12, 27]. A study conducted on a total of 600 TLPs retrieved from 100 species in international databases revealed a cluster of phylogenetically related TLPs, enriched in poplar and tree sequences, that might represent a specific innovation in perennial species. Beyond the dramatic expansion of these defense-related genes in the poplar genome, diversification and subsequent sub- or neo-functionalisation likely occurred in poplar TLPs as exemplified by diversifying selection observed in this cluster [27, 28]. So far, other PR gene families have not been explored at the genome-wide scale in poplar, and it would be interesting to determine whether other expansions of specific gene family related to plant immunity occurred in

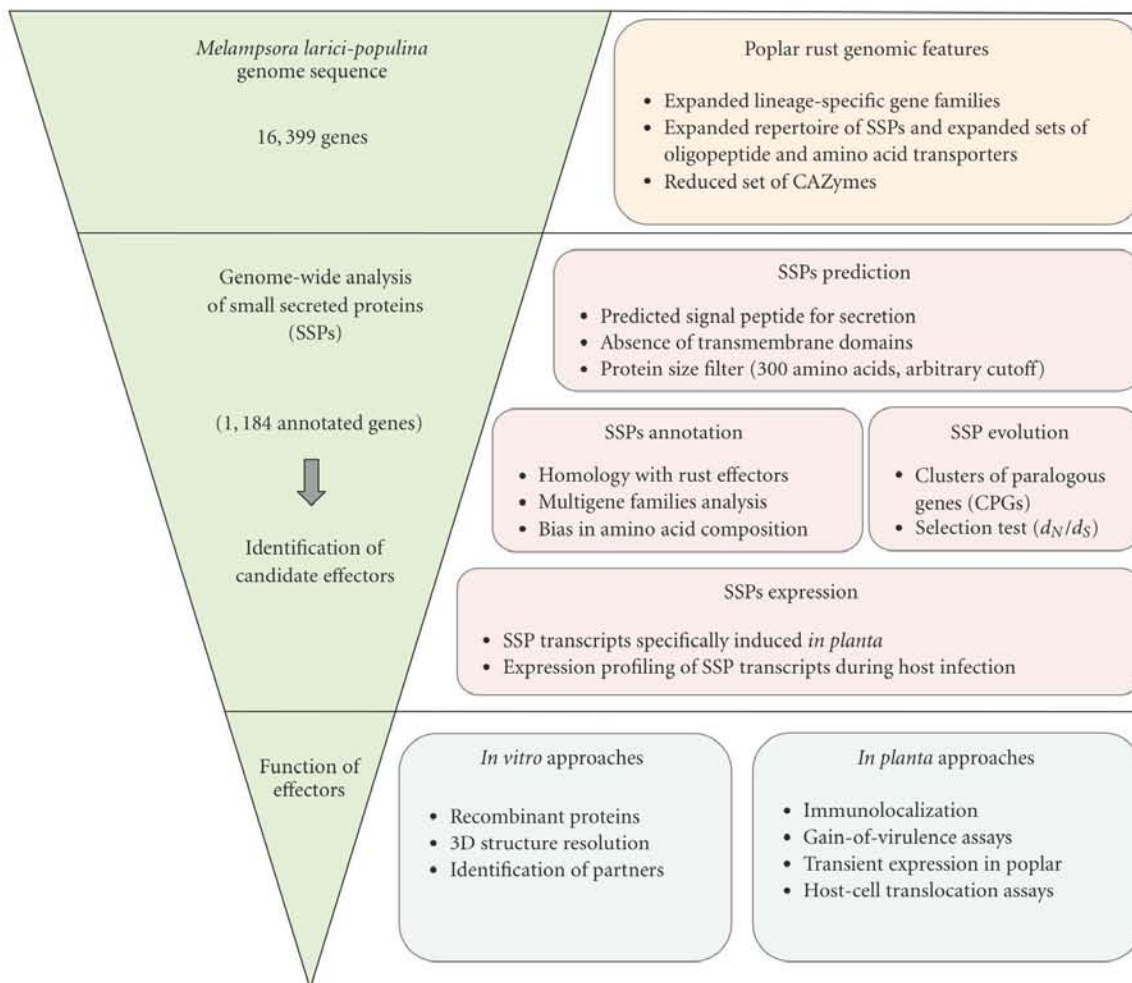


FIGURE 2: Roadmap for effectors identification in *Melampsora larici-populina*.

trees, representing possible innovations in these long-living species.

The genomic hallmarks reflecting the biotrophic lifestyle of the rust fungus *M. larici-populina* were recently uncovered [15]. Among the 16,399 genes reported in the poplar rust genome, a strikingly large number of expanding lineage-specific gene families were identified (909 lineage-specific gene families among 5,304 in total, corresponding to 5,798 genes). Several expanded gene families were also observed in the only other Pucciniales genome sequenced so far (the wheat stem rust *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* [15]), including oligopeptide and amino acid transporters. Among the expanded gene families unique to the poplar rust, 54 (462 genes in total) encode small secreted proteins (SSPs) that represent putative effectors. In addition, other striking features of the poplar rust genome include a reduced set of carbohydrate active enzymes and impaired nitrogen and sulfur assimilation pathways [15]. The genomes of other plant biotrophic pathogens revealed striking similarities with rust fungi genomic hallmarks [29, 30]. A particular attention was given to the genes encoding SSPs in *M. larici-populina* (Figure 2). Indeed, many effector proteins secreted

by biotrophic oomycete and fungal plant pathogens are SSPs of unknown function and their virulence or avirulence activities could determine the outcome of the interaction with the host [20, 21, 31, 32]. Consistent with the “arms race” concept between the plant immune system and pathogen effectors, SSPs could display accelerated evolution rate (i.e., positive/diversifying selection) likely to evade plant R protein-mediated recognition [33, 34]. In *M. larici-populina*, the detailed annotation of predicted SSP genes, followed by expression and adaptive evolution investigations, helped the identification of candidate rust effectors likely involved in the molecular cross-talk between the rust fungus and poplar [17, 35] (Figure 2). A total of 1,184 SSP genes have been identified and represent 7.2% of the total number of genes in the *M. larici-populina* genome [15] (Figure 2). These genes are organized in 169 gene families (the largest contains 111 gene members) dispersed in the genome, and their number supports the current view of fungal effectors as a redundant and diversified reservoir, contrasting with restricted effectors repertoire of biotrophic bacteria [36]. Interestingly, although some SSPs display similarities with effectors previously characterized in related rust species

such as *Melampsora lini* (flax rust) and *Uromyces fabae* (bean rust), the majority of SSPs reported in *M. Larici-populina* (69%) are specific to this rust fungus [15, 17]. Similar observations were made after the analysis of the genome of the obligate biotrophic fungus *Blumeria graminis*, supporting the importance of clade- and lineage-specific effectors in fungi [29]. A striking feature of *M. larici-populina* SSPs is the high content of cysteine residues (63% contain more than 4 cysteines). Although the function of these residues in candidate SSP effectors is not known at the moment, it may be hypothesized that they could have a structural role through disulfide bond formation, known to stabilize proteins and enhance resistance to host proteases [37, 38]. Some of these cysteines reside in a short string of residues conserved between gene members of several SSP families ([Y/F/W]xC). Such a motif was also reported in candidate effectors of the barley powdery mildew *B. graminis* and in the wheat rust fungi *P. graminis* f. sp. *tritici* and *Puccinia triticina*, preferentially in the N-terminal region of the proteins [29, 39]. Godfrey et al. [39] proposed a possible involvement of the motif in the translocation of effectors in host plant cells, similar to the conserved N-terminal RxLR motif of oomycete effectors [40–42]. However, the [Y/F/W]xC motif is also detected in the C-terminal region of some *M. larici-populina* SSPs and is highly represented in larger nonsecreted proteins of diverse functions [15]; thus, the exact role of this motif remains to be determined. Some of the SSPs belonging to gene families were grouped in clusters of paralogous genes (CPGs) of at least three and up to 39 members with high levels of similarities [17] (Hacquard et al., unpublished data). Interestingly, the C-terminal region of SSPs of some CPGs show significant evidence of positive selection, which is strongly suggestive of a diversification of these effector-like gene families upon interaction with the host, likely to evade recognition. Such a diversification is a hallmark of biotroph effectors with avirulence functions [43–47]. Interestingly, some members of these positively selected CPGs harbour relatively well-conserved N-terminal secretion peptide as well as K/R- and D/E-rich regions (Hacquard et al., unpublished data), reminiscent of the host-cell translocation motifs reported in some fungal and oomycete effectors [40–42]. These SSPs represent potential avirulence factor for which biochemical characterisation is ongoing (Figure 2). Beyond the extensive description of the repertoire of putative effectors in the poplar rust fungus genome, such evidence of selection in paralogs argues for the use of large-scale sequencing of candidate effector genes across genus and species (i.e., isolates with distinct pathotypes) to complete the molecular landscape of effector diversity.

3. Poplar-Poplar Rust Transcriptomics: Insights into Plant Defense Reactions and Stage-Specific Fungal Expression Patterns

While genomic analyses reveal the genetic potential of organisms, transcriptomics allow deciphering the regulatory networks controlling the expression of such genetic programs in

space and in time. In complex biotrophic systems involving two species, fine-tune genetic reprogramming occurs in both the host and the parasite to determine the outcome of the interaction [20, 48]. Indeed, plant host-specific resistance mechanisms rely on expression of inducible defense genes, whereas the biotrophic pathogen lifestyle is based on the temporal and local expression of virulence effectors in infection structures (i.e., spores, germ-tubes, invasive hyphae, haustoria).

Transcriptome studies conducted on poplar-poplar rust interactions revealed the early induction of defense responses during the incompatible interaction, referred to as complete or host-specific resistance, whereas a late induction of defense responses was observed in the case of compatible interactions and partial resistance [7, 8, 11, 49, 50] (Figure 3). These studies indicate that defense reactions are governed by common molecular bases in both perennial and annual species. Indeed, defense responses in poplar include the typical set of inducible defense genes such as PR proteins, GSTs (glutathione S-transferases), and redox homeostasis enzymes, as well as genes of the phenylpropanoid pathways [5]. Among the genes induced during host-specific resistance, only a few show no homology with known proteins and might represent innovations in perennial species [7, 27]. Besides, differences in poplar defense reactions set during complete and partial resistances are mainly quantitative and timely regulated [5]. Transcriptome analyses in the model plant *A. thaliana* already demonstrated the quantitative nature of differences between compatible and incompatible interactions [51]. Thus, poplar and *Arabidopsis* (and by extension perennial and annual species) seem to share a conserved set of genes to actively react upon biotroph pathogen attacks. This statement is widely applicable regarding global transcriptome analyses; however, some specificities have been described. Indeed, phylogenetically related groups of TLPs are preferentially induced in infected poplar leaves during partial or complete resistance to the rust fungus [27]. As specified above, a cluster of eleven TLP genes, so far unique to perennial species, is induced during partial resistance of poplar to rust fungi (i.e., at late infection stages of compatible interactions with *Melampsora* spp.) [27]. This regulation pattern contrasts with another clade of poplar TLPs conserved in all plants and that is mostly induced early during incompatible poplar-poplar rust interaction [27].

Transcriptome analyses of poplar leaves infected by either virulent or avirulent strains of *M. larici-populina* at early stages of infection (i.e., earlier than 48 hpi) are ongoing to dissect genetic reprogramming in poplar upon infection by the rust fungus (Petre et al., unpublished data). Preliminary results indicate repression of expression of genes coding for defense-related proteins and secondary metabolism enzymes at 48 compared to 18 and 24 hpi in the compatible interaction. From the “Zig-Zag” model standpoint [20], this could reflect the effector-triggered susceptibility (ETS) that promotes fungal virulence by inhibiting the plant PAMP-triggered immunity (PTI). No more than 10 genes were induced at this stage of the compatible interaction, including a dramatically induced sulphate transporter gene (Figure 3). Such an observation is puzzling since sulphate assimilation

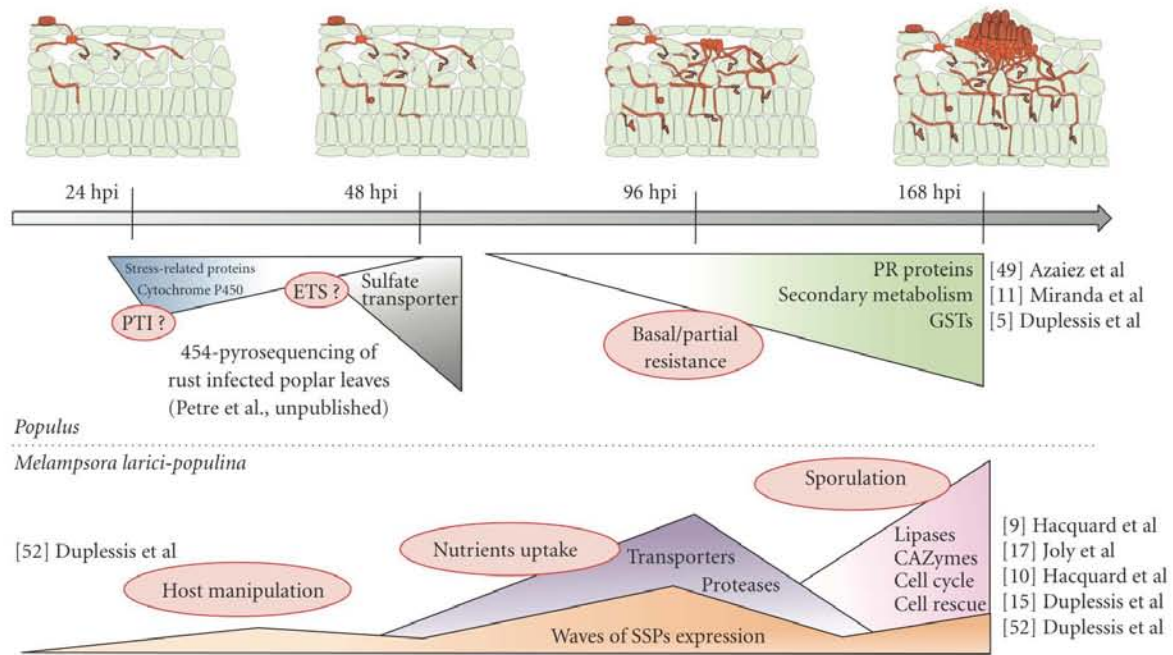


FIGURE 3: Major transcriptome regulations in a compatible *Populus/Melampsora* interaction. Triangles represent genetic programs set up by *Populus* (top) or *M. larici-populina* (bottom), and red circles indicate associated biological functions. PTI: PAMP-triggered immunity; ETS: effector-triggered susceptibility; PR: pathogenesis-related; GSTs: glutathione S-transferases; hpi: hours postinoculation, CAZymes: carbohydrate-active enzymes, SSPs: small secreted proteins.

pathway seems to be impaired in rust fungi [15]. This opens interesting perspective to address the role of sulphate transport, assimilation, and metabolism in rust fungi during compatible poplar-poplar rust interactions and how it could impact host metabolism.

M. larici-populina genetic programs triggered during poplar leaf infection (from urediniospore germination to uredinia formation on poplar leaves; see Figure 1(b)) have been recently investigated with whole-genome custom exon oligoarrays [9, 15, 52]. Interestingly, the set of induced fungal genes greatly differs during host colonisation with preferential transcript expression at early time points (24–48 hpi, haustoria formation), intermediate time points (48–96 hpi, biotrophic growth), and later stages (96–168 hpi, biotrophic growth, uredinia formation and sporulation) (Figure 3). Strikingly, several classes of SSP genes are successively expressed all along the infection, from germination to uredinia formation, suggesting that distinct sets of effectors are expressed to set up, promote, and maintain fungal biotrophy [52]. SSP expression during urediniospore germination or at early stages of infection (i.e., 24–48 hpi) supports an early manipulation of the plant defense system by the fungus in order to promote virulence (Figure 3). In contrast, transcripts encoding proteases and transporters were preferentially induced at 96 hpi when the fungus has already formed many haustoria in host cells, supporting the uptake of host resources and nutrients by the fungal structures as previously reported for the bean rust fungus *U. fabae* (see [53] for a complete review). At later stages of infection, the induction of transcripts encoding

various lipases and carbohydrate active enzymes (CAZymes) was observed concomitantly with uredinia formation (96–168 hpi) reflecting a potential switch in lipid metabolism during the sporulation process [52] (Figure 3). Quite interestingly, four genes encoding SSPs belonging to the same gene family (*M. lini* HESP-417 homologs) were expressed at different infection stages, and their expression profiles were confirmed by RT-qPCR [52]. This result suggests that waves of expression of SSP genes could likely contribute to the turnover/renewal of SSPs at the interface with the host or inside host cells during the biotrophic interaction.

In transcriptomic studies of biotrophic interactions, isolation of transcripts from infected tissues does not give access to specific patterns of gene expression in distinct pathogenic structures. The purification of haustoria from rust-infected bean leaves has paved the way for the molecular analysis of these fungal cell types that play a key role in the establishment of obligate biotrophy. Such an approach has allowed the sequencing of haustoria-specific cDNA and the identification of genes expressed in these infection structures [53–56]. This approach was successfully used to identify several candidate effectors in haustorially expressed secreted proteins (HESPs) of the model rust fungus *M. lini* [57], including several avirulence genes. However, specific *in planta* gene expression in other cell types (i.e., infection hyphae, sporogenous hyphae) was not assessed so far in rust fungi. Isolation of biotrophic infection hyphae from *Colletotrichum higginsianum* was successfully applied to *Arabidopsis* infected leaves for transcriptome analysis [58], and rust infection hyphae and derived infection structures were obtained artificially for

the bean rust fungus *U. fabae* (see [53] for details). The use of laser capture microdissection (LCM) was a major breakthrough to dissect the genetic programs related to biotrophy and sporulation at a late stage of rust infection (168 hpi), whereas various fungal structures are formed *in planta* [9]. LCM allowed the successful isolation of infected mesophyll tissues containing infection hyphae and haustoria, as well as uredinia containing sporogenous hyphae and newly formed urediniospores for downstream expression analysis using *M. larici-populina* whole-genome custom exon oligoarrays [9]. Strikingly, among the most highly induced transcripts detected in fungal biotrophic structures in the LCM-isolated palisade mesophyll (>100-fold induction compared to LCM-isolated uredinia), almost all encode SSPs. This unexpected high number of candidate effectors expressed at this late stage of rust infection might be essential for the maintenance of biotrophy during uredinia formation and sporulation. Preventing structures like haustoria from host detection in photosynthetically active mesophyll might be crucial to preserve the capability of the rust fungus to extract nutrients from the plant toward sporulating structures. Indeed, in nature, sporulation structures are maintained in infected leaves and can produce thousands of urediniospores over several weeks. Transcripts induced in LCM-isolated uredinia are more diverse and include several cell-cycle- and cell-rescue-related transcripts [9]. The induction of cell cycle transcripts is supportive of the intense cell division activity observed in the microdissected sporulation area, while cell-rescue- and defense-related transcripts might reflect an active defense from the rust fungus in response to the late activation of poplar reactions such as oxidative burst or expression of defense genes reported in compatible poplar-poplar rust interactions [5, 8] (Figure 3). Interestingly, transcripts accumulated in the sporulation area were predominantly detected in resting urediniospores and at 168 hpi in the time-course expression study [52]. In contrast, genes induced in the microdissected-infected mesophyll and encoding SSPs were predominantly expressed at 96 hpi during the time-course infection, at a stage that only consists in haustoria and infection hyphae [52]. Such observations support a transcriptional switch between different fungal cell types in infected plant tissues at the stage of uredinia formation and sporulation.

The combination of tools like transcriptomics and LCM clearly demonstrates that a deeper and comprehensive view of rust fungi genetics can be gained from the study of *in planta* infection structures. Future directions will concern the identification of the fungal determinants that control the switch leading to uredinia formation in the host and the molecular bases controlling biotrophy.

4. Toward Candidate Effector Characterisation: The Need for Functional Approaches

Combination of genome and transcriptome analyses led to the definition of a very large repertoire of candidate *M. larici-populina* effectors [15, 17]. Ongoing studies based on high-throughput genome and transcriptome sequencing of

additional poplar rust isolates with defined pathotypes will complete and precise the list of candidate effectors. Thus, the step defined as “effector discovery” by Alfano [59] is rather advanced and almost complete, with an exhaustive inventory of putative effectors for this rust fungal pathogen. The next step will consist in the characterisation of effector virulence/avirulence functions (Figure 2). These functional investigations will be based on the heterologous expression of candidate effector coding sequences in *Escherichia coli* or other production systems for subsequent purification of recombinant proteins. Protein expression patterns, subcellular localisation, biochemical features analyses, and resolution of tridimensional structures as well as protein-protein interaction assays will help to address major questions concerning the role(s) of the highly diverse and redundant set of SSP genes in virulence and biotrophy. Are some effectors translocated into host cells? How do cytoplasmic effectors enter host cells? Where do they localize and is this localisation dynamic upon infection? What are the targets or interactors of fungal effectors in host cells and how do they interact? In order to have an accurate vision of effector functions, putative effector targets should be analyzed in a similar way [59]. Beyond *in vitro* analyses, *in vivo* experiments are also required to validate the effector actions on the host. Many efforts are currently underway to establish assays for genetic transformation in poplar and/or in *Melampsora* to study *in vivo* the function of genes involved in the poplar-poplar rust interaction. Characterisation of virulence function of *M. larici-populina* effectors using a bacterial-based protein injection system in *Arabidopsis* is currently in development (H. Germain and A. Séguin, personal communication). In this system, bacterial growth inside plant leaves is used as a reporter of effector-triggered plant defense inhibition [60]. In addition, transient expression assays of effector proteins in poplar leaves could lead to the characterisation of avirulence functions reported by localized hypersensitive response. Molecular analyses of the flax-flax rust pathosystem represent the most advanced rust pathosystem in the field [57, 61–63] and is inspiring to set strategies toward functional characterisation of poplar rust effectors and avirulence genes. The large range of hybrid poplars harbouring up to eight complete resistances constitutes a robust basis for such future screening experiments.

Acknowledgments

The authors would like to warmly thank all our colleagues at the Tree/Microbe Interactions Joint Unit at INRA and Nancy University for fruitful collaborations in the past years and numerous discussions on the concept of fungal effectors in tree-fungi interactions, particularly Francis Martin, Annegret Kohler, Emilie Tisserant, Valérie Legué, Claire Veneault-Fourrey, and Christine Delaruelle, who contributed to the recent poplar-poplar rust genomics and transcriptomics studies. They would like to also thank David Joly (currently postdoc in the Bakkeren lab, University of British Columbia, Canada) for his efforts in the annotation of *M. larici-populina* candidate effectors and Yao-Cheng

Lin (postdoc at the Ghent VIB, Belgium) for the amazing amount of time dedicated to the analysis of the *Melampsora* genome. The authors also acknowledge their collaborators Armand Séguin and Hugo Germain at the Canadian Forest Service (Québec, Canada) for ongoing development of poplar rust effectors functional assays. Finally, the sequencing and annotation teams at the JGI are acknowledged for their everyday efforts in producing fungal genome sequences of such good quality. S. Hacquard and B. Petre contributed equally to this work.

References

- [1] J. Pinon and P. Frey, "Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance," in *Rust Diseases of Willow and Poplar*, M. H. Pei and A. R. McCracken, Eds., pp. 139–154, CAB International, Wallingford, UK, 2005.
- [2] E. M. Rubin, "Genomics of cellulosic biofuels," *Nature*, vol. 454, no. 7206, pp. 841–845, 2008.
- [3] S. Nagarajan and D. V. Singh, "Long-distance dispersion of rust pathogens," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 28, pp. 139–153, 1990.
- [4] B. Barrès, F. Halkett, C. Dutech, A. Andrieux, J. Pinon, and P. Frey, "Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 8, no. 5, pp. 577–587, 2008.
- [5] S. Duplessis, I. T. Major, F. Martin, and A. Séguin, "Poplar and pathogen interactions: insights from *populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling," *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 28, no. 5, pp. 309–334, 2009.
- [6] F. Laurans and G. Pilate, "Histological aspects of a hypersensitive response in poplar to *Melampsora larici-populina*," *Phytopathology*, vol. 89, no. 3, pp. 233–238, 1999.
- [7] C. Rinaldi, A. Kohler, P. Frey et al., "Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*," *Plant Physiology*, vol. 144, no. 1, pp. 347–366, 2007.
- [8] B. Boyle, V. Levée, L. P. Hamel, M. C. Nicole, and A. Séguin, "Molecular and histochemical characterisation of two distinct poplar *Melampsora* leaf rust pathosystems," *Plant Biology*, vol. 12, no. 2, pp. 364–376, 2010.
- [9] S. Hacquard, C. Delaruelle, V. Legué et al., "Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 23, no. 10, pp. 1275–1286, 2010.
- [10] S. Hacquard, C. Veneault-Fourrey, C. Delaruelle, P. Frey, F. Martin, and S. Duplessis, "Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for *in planta* RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves," *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 75, no. 3, pp. 106–112, 2011.
- [11] M. Miranda, S. G. Ralph, R. Mellway et al., "The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 20, no. 7, pp. 816–831, 2007.
- [12] G. A. Tuskan, S. DiFazio, S. Jansson et al., "The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)," *Science*, vol. 313, no. 5793, pp. 1596–1604, 2006.
- [13] F. Martin, A. Aerts, D. Ahrén et al., "The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis," *Nature*, vol. 452, no. 7183, pp. 88–92, 2008.
- [14] F. Martin, V. Gianinazzi-Pearson, M. Hijri et al., "The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome," *New Phytologist*, vol. 180, no. 4, pp. 747–750, 2008.
- [15] S. Duplessis, C. A. Cuomo, Y. C. Lin et al., "Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 22, pp. 9166–9171, 2011.
- [16] X. Yang, U. C. Kalluri, S. P. DiFazio et al., "Poplar genomics: state of the science," *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 28, no. 5, pp. 285–308, 2009.
- [17] D. L. Joly, S. Hacquard, N. Feau et al., "Chasing effectors in the secretome of *Melampsora larici-populina*," in *Biology of Plant-Microbe Interactions*, H. Antoun, T. Avis, L. Brisson, D. Prévost, and M. Trepanier, Eds., vol. 7, International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN, USA, 2010, Paper 77.
- [18] A. H. Paterson, M. Freeling, H. Tang, and X. Wang, "Insights from the comparison of plant genome sequences," *Annual Review of Plant Biology*, vol. 61, pp. 349–372, 2010.
- [19] A. Kohler, C. Rinaldi, S. Duplessis et al., "Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*," *Plant Molecular Biology*, vol. 66, no. 6, pp. 619–636, 2008.
- [20] J. D. Jones and J. L. Dangl, "The plant immune system," *Nature*, vol. 444, no. 7117, pp. 323–329, 2006.
- [21] P. N. Dodds and J. P. Rathjen, "Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions," *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, no. 8, pp. 539–548, 2010.
- [22] A. Bresson, V. Jorge, A. Dowkiw et al., "Qualitative and quantitative resistances to leaf rust finally mapped within two nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR)-rich genomic regions of chromosome 19 in poplar," *New Phytologist*, vol. 192, no. 1, pp. 151–163, 2011.
- [23] R. W. Innes, C. Ameline-Torregrosa, T. Ashfield et al., "Differential accumulation of retroelements and diversification of NB-LRR disease resistance genes in duplicated regions following polyploidy in the ancestor of soybean," *Plant Physiology*, vol. 148, no. 4, pp. 1740–1759, 2008.
- [24] H. Germain and A. Séguin, "Innate immunity: has poplar made its BED?" *New Phytologist*, vol. 189, no. 3, pp. 678–687, 2011.
- [25] L. Aravind, "The BED finger, a novel DNA-binding domain in chromatin-boundary-element-binding proteins and transposases," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 25, no. 9, pp. 421–423, 2000.
- [26] L. C. van Loon, M. Rep, and C. M. J. Pieterse, "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 44, pp. 135–162, 2006.
- [27] B. Petre, I. Major, N. Rouhier, and S. Duplessis, "Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar," *BMC Plant Biology*, vol. 11, article 33, 2011.
- [28] J. P. Zhao and X. H. Su, "Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*," *Planta*, vol. 232, no. 4, pp. 949–962, 2010.
- [29] P. D. Spanu, J. C. Abbott, J. Anselem et al., "Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism," *Science*, vol. 330, no. 6010, pp. 1543–1546, 2010.

- [30] L. Baxter, S. Tripathy, N. Ishaque et al., "Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome," *Science*, vol. 330, no. 6010, pp. 1549–1551, 2010.
- [31] I. Stergiopoulos and P. J. De Wit, "Fungal effector proteins," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 47, pp. 233–263, 2009.
- [32] B. M. Tyler, "Entering and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens," *Cellular Microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 13–20, 2009.
- [33] G. Aguilera, G. Refrégier, R. Yockteng, E. Fournier, and T. Giraud, "Rapidly evolving genes in pathogens: methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 9, no. 4, pp. 656–670, 2009.
- [34] R. Terauchi and K. Yoshida, "Towards population genomics of effector-effector target interactions," *New Phytologist*, vol. 187, no. 4, pp. 929–939, 2010.
- [35] D. L. Joly, N. Feau, P. Tanguay, and R. C. Hamelin, "Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.)," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, article 422, 2010.
- [36] D. J. Schneider and A. Collmer, "Studying plant-pathogen interactions in the genomics era: beyond molecular Koch's postulates to systems biology," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 48, pp. 457–479, 2010.
- [37] M. Rep, "Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 253, no. 1, pp. 19–27, 2005.
- [38] S. Kamoun, "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 44, pp. 41–60, 2006.
- [39] D. Godfrey, H. Böhlenius, C. Pedersen, Z. Zhang, J. Emmersen, and H. Thordal-Christensen, "Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, article 317, 2010.
- [40] S. C. Whisson, P. C. Boevink, L. Moleleki et al., "A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells," *Nature*, vol. 450, no. 7166, pp. 115–118, 2007.
- [41] R. H. Y. Jiang, S. Tripathy, F. Govers, and B. M. Tyler, "RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 12, pp. 4874–4879, 2008.
- [42] S. D. Kale, B. Gu, D. G. Capelluto et al., "External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells," *Cell*, vol. 142, no. 2, pp. 284–295, 2010.
- [43] J. Win, W. Morgan, J. Bos et al., "Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes," *The Plant Cell*, vol. 19, no. 8, pp. 2349–2369, 2007.
- [44] M. M. Van Der Merwe, M. W. Kinnear, L. G. Barrett et al., "Positive selection in *AvrP4* avirulence gene homologues across the genus *Melampsora*," *Proceedings of the Royal Society B*, vol. 276, no. 1669, pp. 2913–2922, 2009.
- [45] R. L. Allen, P. D. Bittner-Eddy, L. J. Grenville-Briggs et al., "Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew," *Science*, vol. 306, no. 5703, pp. 1957–1960, 2004.
- [46] A. P. Rehmany, A. Gordon, L. E. Rose et al., "Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by *RPP1* resistance genes from two *Arabidopsis* lines," *The Plant Cell*, vol. 17, no. 6, pp. 1839–1850, 2005.
- [47] L. G. Barrett, P. H. Thrall, P. N. Dodds et al., "Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 26, no. 11, pp. 2499–2513, 2009.
- [48] M. Both, M. Csukai, M. P. Stumpf, and P. D. Spanu, "Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen," *The Plant Cell*, vol. 17, no. 7, pp. 2107–2122, 2005.
- [49] A. Azaiez, B. Boyle, V. Levée, and A. Séguin, "Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora rust* fungi," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 22, no. 2, pp. 190–200, 2009.
- [50] V. Levée, I. Major, C. Levasseur, L. Tremblay, J. MacKay, and A. Séguin, "Expression profiling and functional analysis of *Populus WRKY23* reveals a regulatory role in defense," *New Phytologist*, vol. 184, no. 1, pp. 48–70, 2009.
- [51] Y. Tao, Z. Xie, W. Chen et al., "Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*," *The Plant Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 317–330, 2003.
- [52] S. Duplessis, S. Hacquard, C. Delaruelle et al., "*Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and time-course infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 24, no. 7, pp. 808–818, 2011.
- [53] R. T. Voegelé, M. Hahn, and K. Mendgen, "The uredinales: cytology, biochemistry, and molecular biology," in *The Mycota*, H. B. Deising, Ed., vol. 5 of *Plant Relationships*, pp. 69–98, Springer, Berlin, Germany, 2009.
- [54] M. Hahn and K. Mendgen, "Isolation by ConA binding of haustoria from different rust fungi and comparison of their surface qualities," *Protoplasma*, vol. 170, no. 3-4, pp. 95–103, 1992.
- [55] M. Hahn and K. Mendgen, "Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 10, no. 4, pp. 427–437, 1997.
- [56] A. M. Catanzariti, R. Mago, J. Ellis, and P. Dodds, "Constructing haustorium-specific cDNA libraries from rust fungi," *Methods in Molecular Biology*, vol. 712, pp. 79–87, 2011.
- [57] A. M. Catanzariti, P. N. Dodds, G. J. Lawrence, M. A. Ayliffe, and J. G. Ellis, "Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors," *The Plant Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 243–256, 2006.
- [58] H. Takahara, A. Dolf, E. Endl, and R. O'Connell, "Flow cytometric purification of *Colletotrichum higginsianum* biotrophic hyphae from *Arabidopsis* leaves for stage-specific transcriptome analysis," *Plant Journal*, vol. 59, no. 4, pp. 672–683, 2009.
- [59] J. R. Alfano, "Roadmap for future research on plant pathogen effectors," *Molecular Plant Pathology*, vol. 10, no. 6, pp. 805–813, 2009.
- [60] K. H. Sohn, R. Lei, A. Nemri, and J. D. G. Jones, "The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*," *The Plant Cell*, vol. 19, no. 12, pp. 4077–4090, 2007.
- [61] P. N. Dodds, G. J. Lawrence, A. M. Catanzariti, M. A. Ayliffe, and J. G. Ellis, "The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells," *The Plant Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 755–768, 2004.
- [62] M. Rafiqi, P. H. P. Gan, M. Ravensdale et al., "Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen," *The Plant Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 2017–2032, 2010.

- [63] M. Bernoux, T. Ve, S. Williams et al., "Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation," *Cell Host & Microbe*, vol. 9, no. 3, pp. 200–211, 2011.
- [64] E. Markljung, L. Jiang, J. D. Jaffe et al., "ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates IGF2 expression and muscle growth," *Plos Biology*, vol. 7, no. 12, Article ID e1000256, 2009.
- [65] J. Liu, R. Sturrock, and A. K. M. Ekramoddoullah, "The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function," *Plant Cell Reports*, vol. 29, no. 5, pp. 419–436, 2010.
- [66] C. Tsai, S. A. Harding, T. J. Tschaplinski, R. L. Lindroth, and Y. Yuan, "Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*," *New Phytologist*, vol. 172, no. 1, pp. 47–62, 2006.
- [67] B. Hamberger, M. Ellis, M. Friedmann, C. Azevedo Souza, B. Barbazuk, and C. J. Douglas, "Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families," *Canadian Journal of Botany*, vol. 85, no. 12, pp. 1182–1201, 2007.
- [68] P. Bednarek and A. Osbourn, "Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense," *Science*, vol. 324, no. 5928, pp. 746–748, 2009.
- [69] A. Barakat, P. K. Wall, S. DiLoreto, C. W. dePamphilis, and J. E. Carlson, "Conservation and divergence of microRNAs in *Populus*," *BMC Genomics*, vol. 8, article 481, 2007.
- [70] M. Tronchet, C. Balagué, T. Kroj, L. Jouanin, and D. Roby, "Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*," *Molecular Plant Pathology*, vol. 11, no. 1, pp. 83–92, 2010.
- [71] X. Ye, B. G. Kang, L. D. Osburn, Y. Li, and Z. M. Cheng, "Identification of the flavin-dependent monooxygenase-encoding YUCCA gene family in *Populus trichocarpa* and their expression in vegetative tissues and in response to hormone and environmental stresses," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 97, no. 3, pp. 271–283, 2009.
- [72] M. R. Grant and J. D. G. Jones, "Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease," *Science*, vol. 324, no. 5928, pp. 750–752, 2009.
- [73] U. C. Kalluri, S. P. Difazio, A. M. Brunner, and G. A. Tuskan, "Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa*," *BMC Plant Biology*, vol. 7, article 59, 2007.
- [74] J. Zhuang, B. Cai, R. H. Peng et al., "Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 371, no. 3, pp. 468–474, 2008.
- [75] N. Gutterson and T. L. Reuber, "Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 7, no. 4, pp. 465–471, 2004.
- [76] O. Wilkins, H. Nahal, J. Foong, N. J. Provart, and M. M. Campbell, "Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors," *Plant Physiology*, vol. 149, no. 2, pp. 981–993, 2009.
- [77] R. D. Mellway, L. T. Tran, M. B. Prouse, M. M. Campbell, and C. P. Constabel, "The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive MYB134 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar," *Plant Physiology*, vol. 150, no. 2, pp. 924–941, 2009.
- [78] X. C. Zhang, X. Wu, S. Findley et al., "Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants," *Plant Physiology*, vol. 144, no. 2, pp. 623–636, 2007.
- [79] J. Wan, X. Zhang, D. Neece et al., "A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*," *The Plant Cell*, vol. 20, no. 2, pp. 471–481, 2008.
- [80] Q. Liu, C. Zhang, Y. Yang, and X. Hu, "Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in Poplar and Grape," *BMC Plant Biology*, vol. 10, article 117, 2010.
- [81] X. Wang, "Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses," *Plant Physiology*, vol. 139, no. 2, pp. 566–573, 2005.
- [82] M. Garcia-Lorenzo, A. Sjodin, S. Jansson, and C. Funk, "Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*," *BMC Plant Biology*, vol. 6, article 30, 2006.
- [83] M. Solomon, B. Belenghi, M. Delledonne, E. Menachem, and A. Levine, "The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants," *The Plant Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 431–444, 1999.
- [84] X. H. Yang, U. C. Kalluri, S. Jawdy et al., "The F-box gene family is expanded in herbaceous annual plants relative to woody perennial plants," *Plant Physiology*, vol. 148, no. 3, pp. 1189–1200, 2008.
- [85] A. Block, G. Li, Z. Qing Fu, and J. R. Alfano, "Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 11, no. 4, pp. 396–403, 2008.
- [86] I. T. Major and C. P. Constabel, "Functional analysis of the kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores," *Plant Physiology*, vol. 146, no. 3, pp. 888–903, 2008.
- [87] J. Li, G. Brader, and E. T. Palva, "Kunitz trypsin inhibitor: an antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin b1 in *Arabidopsis*," *Molecular Plant*, vol. 1, no. 3, pp. 482–495, 2008.
- [88] L. Peal, N. Jambunathan, and R. Mahalingam, "Phylogenetic and expression analysis of RNA-binding proteins with triple RNA recognition motifs in plants," *Molecules and Cells*, vol. 31, no. 1, pp. 55–64, 2010.
- [89] Z. Q. Fu, M. Guo, B. R. Jeong et al., "A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quenches plant immunity," *Nature*, vol. 447, no. 7142, pp. 284–288, 2007.
- [90] T. Lan, Z. Yang, X. Yang, Y. Liu, X. Wang, and Q. Zenga, "Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family," *The Plant Cell*, vol. 21, no. 12, pp. 3749–3766, 2009.
- [91] D. P. Dixon, M. Skipsey, and R. Edwards, "Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism," *Phytochemistry*, vol. 71, no. 4, pp. 338–350, 2010.
- [92] J. Couturier, J. Jacquot, and N. Rouhrie, "Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 15, pp. 2539–2557, 2009.
- [93] N. Rouhrie, S. D. Lemaire, and J. Jacquot, "The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation," *Annual Review of Plant Biology*, vol. 59, pp. 143–166, 2008.

Chapitre I

PARTIE IV : OBJECTIFS DE LA THESE

1. Contexte général des recherches sur la physiologie moléculaire des interactions biotrophes au sein de l'UMR IAM

L'UMR IAM a entre autres pour objectif de mieux comprendre la physiologie moléculaire des interactions biotrophes au sein des écosystèmes forestiers. Pour ce faire, trois espèces sont utilisées comme modèles : un arbre, le peuplier, et deux champignons basidiomycètes biotrophes, *L. bicolor* et *M. larici-populina* (Figure 45). *L. bicolor* interagit de manière symbiotique avec les racines de peuplier pour former des ectomycorhizes, tandis que *M. larici-populina* est un agent pathogène qui infecte les feuilles de l'arbre. Les génomes de ces trois espèces ont été séquencés et analysés ces dernières années : peuplier, 1^{er} génome d'arbre (Tuskan *et al.*, 2006), *L. bicolor*, 1^{er} génome de champignon symbiotique (Martin *et al.*, 2008) et *M. larici-populina*, 1^{er} génome de rouille (Duplessis *et al.*, 2011a). La disponibilité de ces génomes a permis d'engager les approches dites de post-génomique. Premièrement, l'annotation de plusieurs familles de gènes a été effectuée, en se focalisant sur les fonctions supposées clefs lors des interactions biotrophes. Par exemple chez le peuplier, les familles codant des oxidoréductases (glutarédoxines, thiorédoxines, protéines disulfide-isomérases) ou des protéines dites de résistance NB-LRR ont été analysées (Couturier *et al.*, 2009 ; Chibani *et al.*, 2009 ; Selles *et al.*, 2010 ; Kohler *et al.*, 2008). Chez *L. bicolor*, les transporteurs de nitrates ou encore les effecteurs candidats MiSSP (mycorrhiza induced-small secreted proteins) ont également été décrits (Lucic *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2008). Chez *M. larici-populina*, conjointement à l'analyse globale du génome, une étude préliminaire des effecteurs candidats de type SSP a été réalisée (Duplessis *et al.*, 2011a). Ces études, replacées dans un contexte plus global, ont permis de mieux comprendre l'évolution et la diversification de familles multigéniques au cours de l'évolution des champignons et des plantes. Dans un second temps, ces approches d'analyse *in silico* ont été couplées à des analyses transcriptomiques pour définir les dynamiques d'expression de ces gènes (Felten *et al.*, 2009 ; Duplessis *et al.*, 2011b). A ce niveau, les nouvelles technologies de séquençage du transcriptome à haut débit (RNA-Seq) ont été testées et remplacent aujourd'hui les méthodes classiques basées sur les puces à oligonucléotides (Fernandez *et al.*, 2012 ; Tisserant *et al.*, 2011 ; Martin *et al.*, 2010). Finalement, ces analyses descriptives ont permis de réaliser par la suite des analyses plus ciblées sur certains membres des

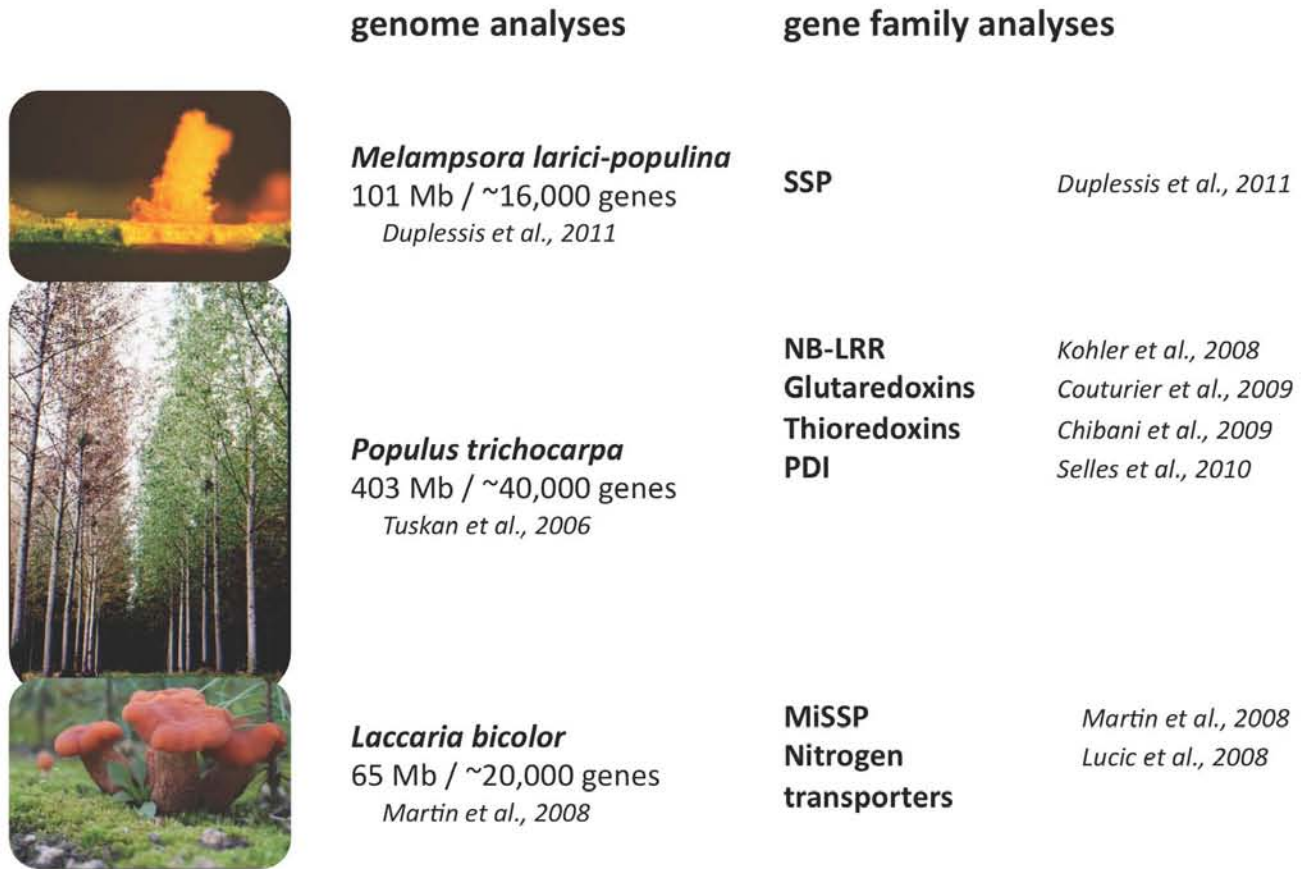


Figure 45. Les approches génomiques sur le peuplier et son microbiome au sein de l'UMR IAM

L'Unité Mixte de Recherche Interactions Arbres-Microorganismes s'est investie dans le séquençage du génome du peuplier et du microbiome fongique biotrophe associé. Ces projets ont réalisé des avancées majeures dans l'analyse des génomes (*P. trichocarpa*, 2006, : 1^{er} génome d'arbre, *L. bicolor*, 2008, 1^{er} génome de champignon symbiotique, *M. larici-populina*, 2011, 1^{er} génome d'une rouille fongique). Les analyses de plusieurs familles multigéniques impliquées dans les réponses de défense chez le peuplier ou dans le mode de croissance biotrophe des champignons ont été réalisées. SSP: small-secreted proteins; PDI: protein-disulfide isomerase; MiSSP: Mycorrhiza induced-small secreted protein.

photos P. Frey, B. Petre, D. Vairalles

familles multigéniques, afin d'effectuer leur caractérisation fonctionnelle (Couturier *et al.*, 2011 ; Plett *et al.*, 2011 ; Chibani *et al.*, 2012).

Plusieurs analyses transcriptomiques ont été menées sur le pathosystème peuplier-*Melampsora* spp., par l'UMR IAM mais aussi par des laboratoires Canadiens (Figure 46 ; Duplessis *et al.*, 2009 ; Hacquard *et al.*, 2010c, 2011). Du côté du peuplier, l'objectif de ces études était de décrire la régulation des gènes mobilisés par la plante pour se défendre, essentiellement lors de la résistance basale à des moments tardifs de l'interaction (Miranda *et al.*, 2007 ; Azaiez *et al.*, 2009 ; Levée *et al.*, 2009). Une seule étude a suivi l'expression des gènes à des temps plus précoces de l'interaction incompatible, lors de la mise en place de la résistance complète à *M. Larici-populina* (Rinaldi *et al.*, 2007 ; Figure 42). Ces études ont globalement montré que les programmes de défense du peuplier sont semblables à ceux d'arabidopsis, bien que certains gènes spécifiques du peuplier aient été identifiés. Du côté du champignon, ces analyses ont décrit la dynamique d'expression des gènes durant l'interaction compatible ou au sein des structures d'infection comme les haustoria ou les tissus biotrophes et sporifères à des temps tardifs de l'infection (Joly *et al.*, 2010 ; Hacquard *et al.*, 2010a ; Duplessis *et al.*, 2011). Une attention particulière a porté sur l'expression fortement régulée dans le temps et dans l'espace des gènes codant des petites protéines sécrétées (i.e. effecteurs candidats) qui contribuent vraisemblablement à la virulence du champignon.

2. Objectifs de la thèse

Lors de mon arrivée en thèse, les études menées sur le pathosystème peuplier/M. larici-populina avaient déjà établi des listes de protéines candidates potentiellement impliquées dans la résistance de la plante ou dans la virulence du champignon. Un des mes objectifs principaux a été d'engager la caractérisation fonctionnelle de ces protéines. A ce titre, j'ai pu contribuer au développement de certains outils d'analyse fonctionnelle au sein de l'UMR. En parallèle, un effort constant était toujours en cours pour compléter l'analyse et l'annotation des génomes de nos organismes modèles. J'ai pu participer à cet effort au travers de l'exploitation des données génomiques et l'analyse de familles multigéniques in silico. Enfin, l'utilisation de la technique de RNA-Seq se développant dans l'UMR, j'ai pu compléter notre connaissance du transcriptome de l'interaction peuplier/M. larici-populina lors d'un projet en collaboration avec le Génoscope. Globalement, j'ai participé à

Chapitre I

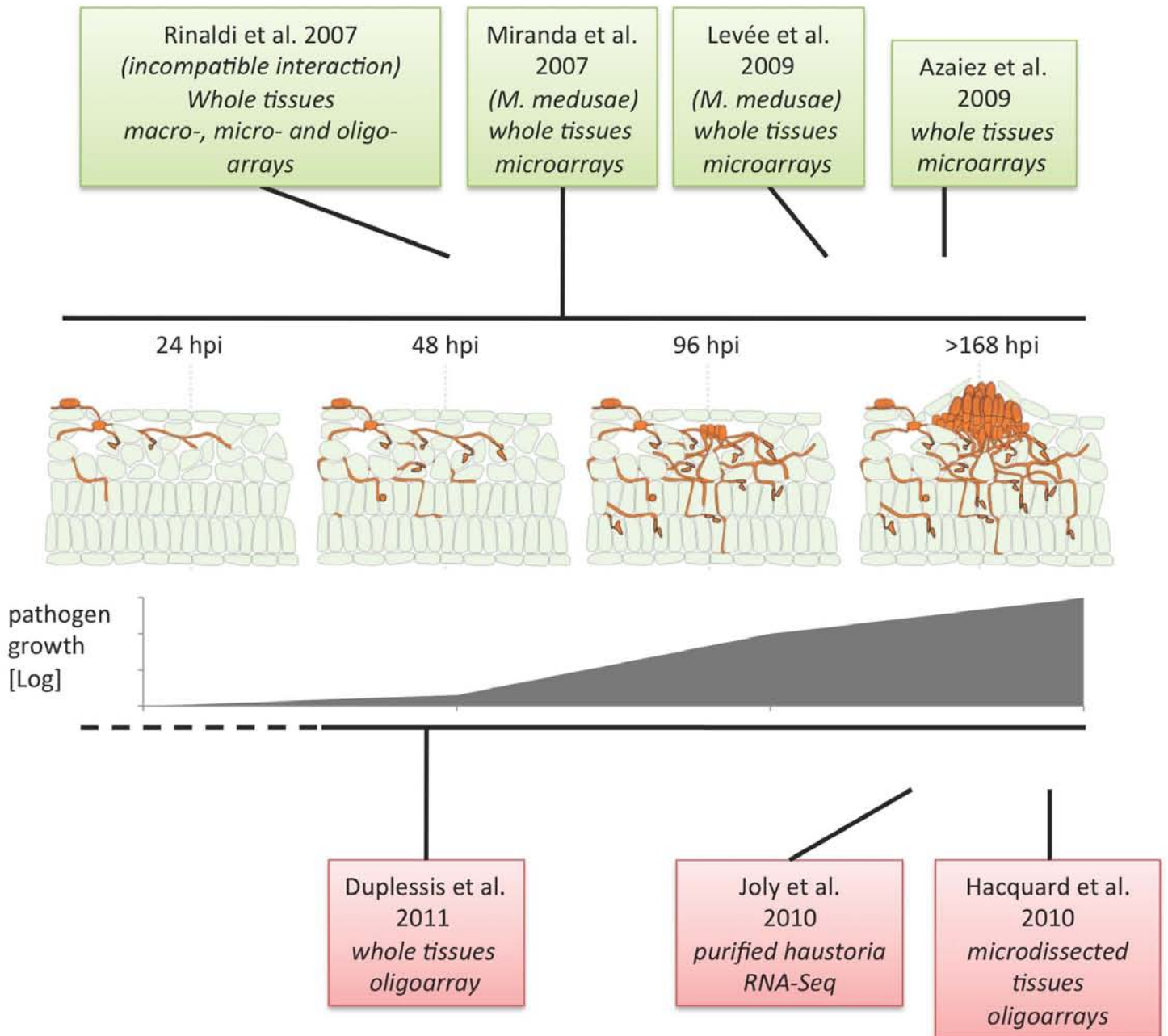


Figure 46. Les approches transcriptomiques sur le pathosystème peuplier/*Melampsora* spp.

En sept à 10 jours, les *Melampsora* spp. effectuent leurs cycles végétatifs sur feuille de peuplier. Après 24 heures post-inoculation (hpi), une urédospore a germé à la surface d'une feuille, pénétré dans la feuille via les stomates et ramifié des hyphes d'infection qui différencient des haustoria au sein des cellules de l'hôte. A partir de 48 hpi, la colonisation du champignon s'accélère et au delà de 96 hpi un programme de sporulation s'enclenche. A partir de sept jours (168 hpi) des urédies déchirent l'épiderme des feuilles et libèrent de nouvelles spores. Entre 24 et 168 hpi, la quantité d'ITS (internal transcribed spacer) fongique est multipliée par 1000 dans les feuilles. Les analyses du transcriptome du peuplier (en vert) ou du champignon (en rouge) aux différents moments de l'interaction sont présentées. Ces approches ont majoritairement utilisé les techniques basées sur l'hybridation sur des puces à ADN et ont été menées à partir de transcrits isolés sur tissus entiers, microdisséqués ou purifiés. La ligne en pointillés indique que le transcriptome de *M. larici-populina* a été suivi à 24 hpi mais la forte dilution des transcrits fongiques parmi les transcrits végétaux a rendu cette approche peu sensible.

Adapté de Hacquard, thèse de doctorat Université de Lorraine, 2010 / Hacquard et al., PMPP, 2010

six différents projets de recherche au cours de ma thèse. Ces projets ont été regroupés dans les chapitres II à VI de ce manuscrit (Figure 47).

2.1. Analyse transcriptomique des temps précoces de l'interaction peuplier/*Melampsora larici-populina* par pyroséquençage 454 (Chapitre II)

Le transcriptome des temps précoces d'infection du peuplier par *M. larici-populina* a très peu été caractérisé. C'est pourtant à ces temps précoces qu'est déterminée l'issue de l'interaction. Les facteurs moléculaires qui assurent ce déterminisme, et que l'on cherche à identifier, sont probablement mis en jeu durant ces premiers contacts entre l'hôte et le parasite. Au cours de ce projet, nous avons analysé par pyroséquençage les transcrits de feuilles de peuplier infectées par *M. larici-populina* à six temps précoces d'interaction, dans le but d'identifier des transcrits du champignon pouvant coder des effecteurs candidats. Coté peuplier, l'analyse quantitative du transcriptome a été effectuée et comparée aux approches classiques par puces à ADN, afin d'identifier des gènes régulés précocement par la colonisation du champignon.

2.2. Analyse *in silico* des thaumatin-like proteins du peuplier (Chapitre III)

Les thaumatin-like proteins (TLP) constituent une grande famille multigénique codant des protéines de réponse aux stress chez les plantes. Plusieurs transcrits ont été identifiés parmi les plus induits dans les feuilles de peuplier infectés par *M. larici-populina*. En 2009, aucune analyse globale des TLP chez les plantes n'avait encore été publiée alors que les TLP font l'objet d'intenses recherches dans différents domaines de la biologie (137 articles référencés ces 5 dernières années dans PubMed pour le mot clef 'thaumatin'). Au cours de ce projet, nous avons conduit une analyse *in silico* des TLP chez le peuplier, mais également chez les autres génomes de plantes et quelques eucaryotes. Une analyse exhaustive des données transcriptomiques, fonctionnelles, structurales et phylogénétiques a été engagée pour tenter de décrypter l'évolution de cette famille.

2.3. Analyse de *Risp*, une protéine de défense multifonction du peuplier (Chapitre IV et V)

Le gène *Risp* (*Rust-induced secreted protein*) est le gène le plus fortement induit lors de la résistance hôte-spécifique du peuplier à *M. larici-populina*. Il code une petite protéine sécrétée qui présente toutes les caractéristiques des protéines antimicrobiennes et qui ne possède pas d'homologues dans les bases de données. Ce projet de recherche a eu pour but l'analyse fonctionnelle de cette petite protéine, via la caractérisation

Chapitre I

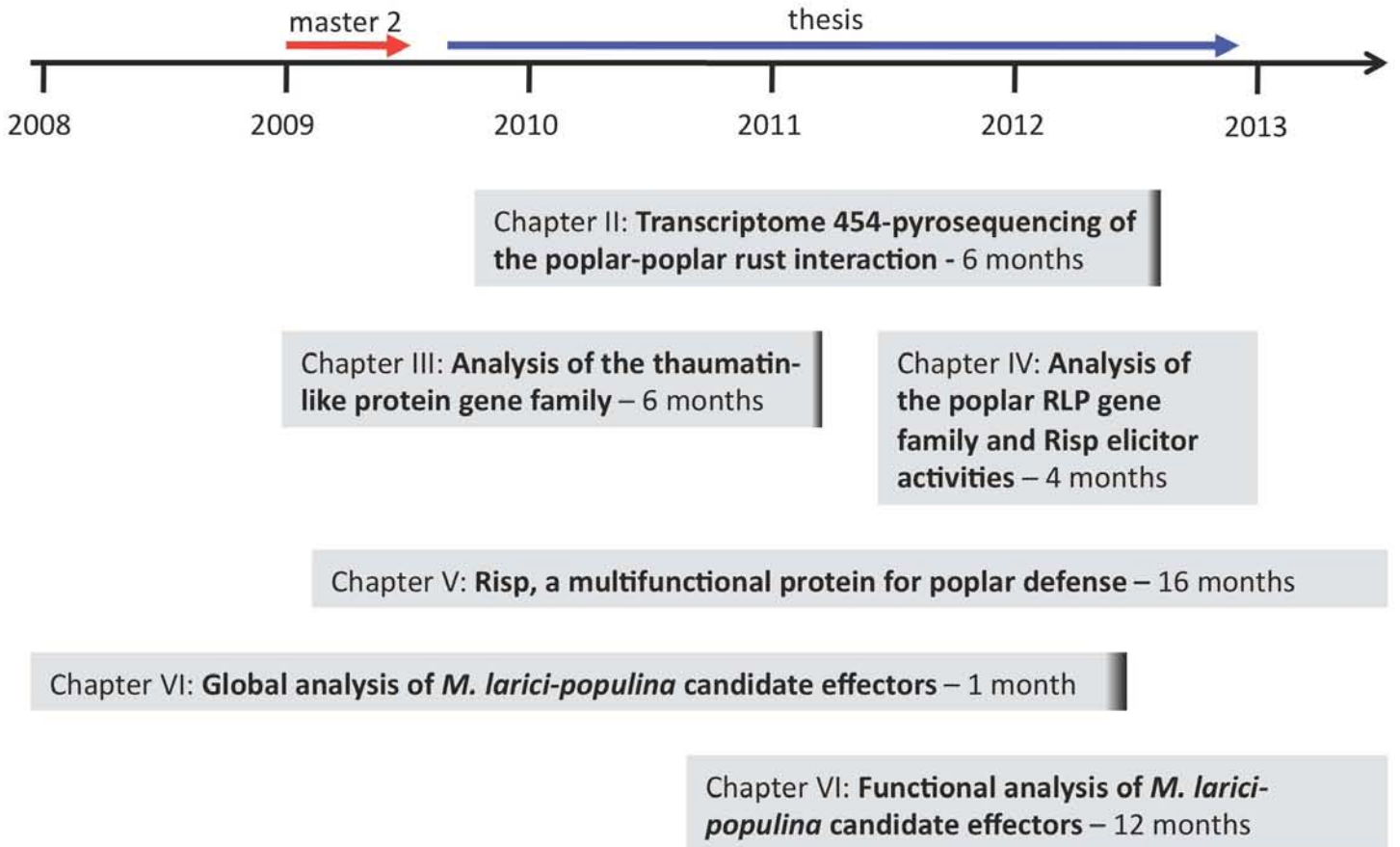


Figure 47. Objectifs et avancement des projets de recherche menés durant la thèse

Les cadres couvrent les périodes sur lesquelles les projets de recherche ont été menés, la bande noire verticale indique la date de publication. L'estimation du temps effectif alloué au projet est indiquée en mois.

biochimique et structurale de la protéine recombinante. Différents tests d'activité antifongiques, des expériences de pull-down et des tests d'alkalinisation cellulaire ont été développés à cette occasion (chapitre V). Ces analyses nous ont également conduit à étudier l'organisation génomique et l'expression des gènes codant des LRR RLP chez le peuplier (chapitre IV).

2.4. Analyse des effecteurs candidats de *M. larici-populina* (Chapitre VI)

A partir de la séquence génomique de *M. larici-populina*, une analyse systématique des gènes codant des petites protéines sécrétées était en cours lors de mon arrivée au sein de l'UMR IAM. Le but de ces analyses étant d'une manière globale de décrire le répertoire d'effecteurs candidats de *M. larici-populina*, et d'une manière plus ciblée d'établir une liste de protéines ayant une forte probabilité d'être des effecteurs et devant être analysées en priorité. J'ai été associé à l'analyse globale du sécrétome via l'analyse de l'expression de quelques gènes codant de petites protéines sécrétées par RT-qPCR. Deux effecteurs candidats membres des familles MlpP4 et MlpH1 ont notamment été identifiés. Mon travail a consisté à engager l'analyse fonctionnelle de ces candidats en me focalisant sur leurs activités de virulence, l'analyse biochimique et structurale des protéines recombinantes et l'identification des protéines ciblées *in planta*. Ce dernier projet nécessite encore quelques analyses qui seront poursuivies par d'autres chercheurs de l'UMR IAM dans un futur proche.

CHAPITRE II : Analyse transcriptomique des temps précoces de l'interaction peuplier/*Melampsora larici-populina* par pyroséquençage 454

CHAPITRE II

Analyse transcriptomique des temps précoces de l'interaction peuplier/*Melampsora larici-populina* par pyroséquençage 454

Résumé du chapitre II

Analyse transcriptomique des temps précoces de l'interaction peuplier/*Melampsora larici-populina* par pyroséquençage 454

Ces dernières années, plusieurs analyses basées sur l'utilisation de puces à ADN NimbleGen Systems, ont permis de décrire finement le transcriptome à la fois de feuilles de peuplier lors d'infection par la rouille et du champignon *M. larici-populina* à différents stades de la colonisation de son hôte. Ces approches ont notamment révélé les gènes associés aux réponses de défense précoces et tardives du peuplier, ainsi que les gènes fongiques induits lors de l'infection et jouant probablement un rôle déterminant lors de l'infection. Cependant, ces technologies d'analyse traditionnelles du transcriptome, par hybridation d'ADNc sur puces à oligonucléotides, ne sont pas assez sensibles pour quantifier les transcrits fongiques aux temps précoces de l'infection (notamment de 18 heures post-inoculation [hpi], correspondant à la formation des premiers haustoria, jusqu'à 48 hpi, début de la phase de croissance exponentielle du champignon). Or, c'est durant ce laps de temps que l'on suppose que les effecteurs permettant d'établir une relation compatible avec l'hôte sont exprimés et mis en jeu.

L'objectif premier de ce projet était d'identifier des gènes de champignon exprimés à des stades très précoces d'infection. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique d'infection de disques foliaires de peuplier par une souche avirulente et une souche virulente de *M. larici-populina*. L'accumulation des transcrits du peuplier et du champignon a été suivie simultanément par pyroséquençage 454 à six temps différents (18, 21 et 24 hpi pour la souche avirulente et 18, 24 et 48 hpi pour la souche virulente). Parmi plus de 800.000 séquences obtenues, seulement 600 transcrits de champignons ont été détectés, dont quelques-uns codant des effecteurs candidats. Nous avons d'autre part concentré notre analyse sur les données d'expression obtenues pour le peuplier, en les comparant quantitativement avec des données obtenues à partir des mêmes échantillons biologiques sur des puces à oligonucléotides. Cela nous a permis de montrer que l'approche par pyroséquençage ne sature pas le transcriptome de peuplier, indiquant que ce n'est pas l'approche la plus adéquate pour une analyse exhaustive et quantitative de l'expression génique. Néanmoins, en se focalisant sur les transcrits les plus fortement accumulés, nous avons montré une bonne reproductibilité entre les approches mises en œuvre. Enfin, ces analyses ont révélé que le transcriptome du peuplier est extrêmement stable aux temps précoces d'infection, excepté pour un transporteur de sulfate dont les transcrits sont fortement accumulés à 48 hpi.

Ce chapitre de thèse est constitué d'un article de recherche rédigé en anglais et intitulé '*RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers *PtSultr3;5*, a fungal-induced host sulfate transporter*' publié le 30 août 2012 dans la revue PLoS ONE et dont je suis le premier auteur. Dans le cadre de ce projet collaboratif, le pyroséquençage et le traitement primaire des données issues du séquençage ont été assurés respectivement par le Génoscope (Evry, France) et par l'équipe de bio-informatique de l'UMR IAM. L'analyse des transcrits fongique a été réalisée par Sébastien Duplessis, et j'ai effectué l'ensemble des autres analyses.

Article n° 2 : RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers PtSultr3;5, a fungal-induced host sulfate transporter

Benjamin Petre, Emmanuelle Morin, Emilie Tisserant, Stéphane Hacquard, Corinne Da Silva, Julie Poulain, Christine Delaruelle, Francis Martin, Nicolas Rouhier, Annegret Kohler, Sébastien Duplessis

Article publié le 30 août 2012 dans la revue 'PLOS ONE'

doi:10.1371/journal.pone.0044408

Quinze fichiers de matériel supplémentaire sont disponibles sur le site Internet de PLOS ONE

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0044408>

RNA-Seq of Early-Infected Poplar Leaves by the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Uncovers *PtSultr3;5*, a Fungal-Induced Host Sulfate Transporter

Benjamin Petre¹, Emmanuelle Morin^{1,3}, Emilie Tisserant^{1,3}, Stéphane Hacquard^{1,3}, Corinne Da Silva², Julie Poulain², Christine Delaruelle¹, Francis Martin¹, Nicolas Rouhier¹, Annegret Kohler¹, Sébastien Duplessis^{1*}

1 Unité Mixte de Recherche 1136 'Interactions Arbres/Microorganismes', INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)/Université de Lorraine, Centre INRA de Nancy, Champenoux, France, **2** CEA-Genoscope, Centre National de Séquençage, Evry, France

Abstract

Biotroph pathogens establish intimate interactions with their hosts that are conditioned by the successful secretion of effectors in infected tissues and subsequent manipulation of host physiology. The identification of early-expressed pathogen effectors and early-modulated host functions is currently a major goal to understand the molecular basis of biotrophy. Here, we report the 454-pyrosequencing transcriptome analysis of early stages of poplar leaf colonization by the rust fungus *Melampsora larici-populina*. Among the 841,301 reads considered for analysis, 616,879 and 649 were successfully mapped to *Populus trichocarpa* and *M. larici-populina* genome sequences, respectively. From a methodological aspect, these results indicate that this single approach is not appropriate to saturate poplar transcriptome and to follow transcript accumulation of the pathogen. We identified 19 pathogen transcripts encoding early-expressed small-secreted proteins representing candidate effectors of interest for forthcoming studies. Poplar RNA-Seq data were validated by oligoarrays and quantitatively analysed, which revealed a highly stable transcriptome with a single transcript encoding a sulfate transporter (herein named *PtSultr3;5*, POPTR_0006s16150) showing a dramatic increase upon colonization by either virulent or avirulent *M. larici-populina* strains. Perspectives connecting host sulfate transport and biotrophic lifestyle are discussed.

Citation: Petre B, Morin E, Tisserant E, Hacquard S, Da Silva C, et al. (2012) RNA-Seq of Early-Infected Poplar Leaves by the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Uncovers *PtSultr3;5*, a Fungal-Induced Host Sulfate Transporter. PLoS ONE 7(8): e44408. doi:10.1371/journal.pone.0044408

Editor: Zhengguang Zhang, Nanjing Agricultural University, China

Received: April 5, 2012; **Accepted:** August 2, 2012; **Published:** August 30, 2012

Copyright: © 2012 Petre et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by grants of the CG Lorraine (France) to S. Duplessis and F. Martin and an INRA innovating grant to S. Duplessis. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Sequencing was supported by the CEA-Genoscope in the frame of a collaborative project. The CEA-Genoscope had no role in the study design, analysis of the data or preparation of the manuscript. The CEA-Genoscope was in charge of 454-data production and collection, and provided agreement on the final version of the manuscript prior publication.

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

* E-mail: duplessi@nancy.inra.fr

† These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Department of Plant Microbe Interactions, Max-Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany

Introduction

Parasitic microbes continuously challenge plants but constitutive and inducible host immunity is generally sufficient to confer broad-spectrum resistance to non-adapted pathogens [1]. A successful infection requires that microbes secrete effectors into infected tissues to repress and manipulate host defense and physiology, resulting in the promotion of biotrophic growth and the proper setting of compatible interaction [2]. In turn, plants possess several hundreds of resistance (R) proteins that, upon direct or indirect recognition of pathogen effectors, trigger strong defense responses and lead to incompatibility [3]. The issue of an interaction as compatible or incompatible is determined within hours following the formation of the first structures of infection and subsequent effector secretion, even after the very first physical contacts [4]. At these early stages, the ability of pathogen effectors to rapidly and efficiently manipulate host functions and simultaneously escape R protein recognition is thought to be the key of compatibility [5]. Identification of both effectors and pathogen-

modulated host-functions is currently a major goal to unravel molecular basis of plant-microbe interactions [6]. To date, most fungal effectors identified are lineage-specific small-secreted proteins (SSP) of unknown function and hundreds of such SSP coding-genes (i.e. candidate effectors) have been identified in fungal genomes [7–11]. Host functions targeted by bacterial effectors are mostly restricted to the plant immune system signaling network, vesicle trafficking, protein degradation systems and transcription of specific transporters [12]. Only a handful of eukaryote effector targets are currently known but the larger effector candidate repertoires compared with those of prokaryotes suggests specialized host manipulations likely linked to nutrient acquisition strategies, infection structures (e.g. haustoria) formation and host reprogramming [13–15].

Genome sequences of *Populus trichocarpa* and *Melampsora larici-populina* are available, making the poplar-poplar rust interaction an emerging model for post-genomic studies of tree immunity and fungal biotrophy [16–17]. Several genome-wide analyses uncovered the huge expansion and diversification of defense- or

virulence-related gene families in poplar and the poplar rust fungus, respectively (for a recent review, see [18]). Several transcriptomic studies identified defense response genes in poplar upon infection by *Melampsora* spp. between 2 and 10 days after inoculation during compatible or incompatible interactions (for a review, see [19]). *M. larici-populina* transcriptome analyses were also conducted during a compatible time-course infection as well as in specific infection structures captured by laser microdissection at late sporulating stages [11,20–21]. A major output of these studies is the timely coordinated and structure-specific expression of hundreds of genes encoding SSPs all along the infection process, suggesting an early and sustained host manipulation [18]. Contrasting with the flow of data gained on both the host and the pathogen transcriptomes at late stages of infection, our knowledge of the first two days of infection remains limited, whereas they encompass a crucial step in setting the outcome of the interaction.

Next-generation sequencing technologies have been an important breakthrough for sensitive, quantitative, annotation-independent and high-throughput transcriptome analyses referred to as RNA-Seq [22–24]. Recent works reported the use of RNA-Seq (Illumina or 454-pyrosequencing) to get insights into the transcriptomes of plant-microbe associations [25–27]. Using original or phylogenetically related reference genomes, the authors were able to discriminate microbial and host transcripts. In the poplar-poplar rust pathosystem, the availability of both well-annotated genome sequences would greatly facilitate this kind of approach.

In the present study, we used 454-pyrosequencing to analyse the transcriptome of compatible and incompatible poplar-poplar rust interactions within the first two days of infection. Methodological aspects such as discrimination of reads origin (poplar vs. poplar rust) and poplar RNA-Seq data validation by oligoarrays were considered. This work identified five early-expressed candidate effectors from *M. larici-populina* as well as an early-induced sulfate transporter from poplar (*PiSultr3;5*). These data complete our knowledge of the poplar-poplar rust interaction and will help prioritizing functional studies in this pathosystem.

Results and Discussion

454-pyrosequencing Transcriptome of Poplar Leaves Infected by *M. larici-populina*

A time-course infection of poplar leaf disks inoculated with either the virulent strain 98AG31 (compatible interaction) or the avirulent strain 93ID6 (incompatible interaction) of *M. larici-populina* has been established and tissues were harvested at 18, 21 and 24 hours post-inoculation (hpi) for the incompatible interaction (I₁₈-I₂₁-I₂₄) and 18, 24 and 48 hpi for the compatible interaction (C₁₈-C₂₄-C₄₈) (see Fig. S1 for a summary of all experiments and analyses presented in this study). *M. larici-populina* haustoria are formed in both compatible and incompatible interactions as soon as 17 hpi [28], and the first poplar defense responses are observed only in incompatible interactions at 48 hpi [29]. Studies conducted on the flax rust and the bean rust model systems showed that haustoria are key structures for rust fungi to secrete effectors into their host [30–33]. Thus, our experiment was designed to identify early-expressed putative rust effectors (i.e. after haustoria formation, between 18 and 24 hpi) as well as early-regulated poplar genes not previously reported. A later time-point in the compatible interaction (C₄₈) was included to define the dynamic of SSP expression and to detect modulation in the host transcriptome. For each time-point, cDNA were sequenced by 454-pyrosequencing (GS-FLX titanium), generating a total of

841,301 high-quality nucleotide reads (~304 Mb) with an average length of 356 bp (Table 1, Fig. S2). For the six conditions, we independently assembled reads into contigs. As presented in Table 1, a total of 713,505 reads were assembled into 90,398 contigs. The average contig size is 659 pb whereas the average number of read per contigs is around 8 (Fig. S2). Homology searches against both *P. trichocarpa* and *M. larici-populina* genome sequences attributed more than 97% of the assembled reads (694,138) to poplar (693,489) or the poplar rust (649) genes (Table 1). This approach will hereafter be referred to as 'contig-blast method'. We used a second method for read processing, which consisted in the mapping of all the reads onto the reference genomes and current available annotations after reassembly using the Program to Assemble Spliced Alignments (PASA; [34]) (herein called 'read-mapping method'). This method identified 616,879 and 359 reads corresponding to *P. trichocarpa* and *M. larici-populina* genes, respectively, which is comparable to the numbers gained by the contig-blast method (Table 1). Moreover, expression levels of poplar transcripts (i.e. number of reads per transcripts) estimated by both approaches correlated well, indicating that these methods provide similar outputs (Fig. S3). The data processed through the read-mapping method were more stringent and thus retained for the quantitative analysis of poplar transcript levels, whereas the contig-blast method was retained for the analysis of *M. larici-populina* transcripts.

M. larici-populina Early-expressed Transcripts and Candidate Effectors

A total of 649 reads were aligned to 361 *M. larici-populina* genes by the contig-blast method, whereas 359 reads were mapped to 280 *M. larici-populina* genes by the read-mapping method (Table 1). In total, 97% of the genes identified by the read-mapping method were also retrieved by the contig-blast method. The lower number of genes identified by the read-mapping method are due to intrinsic differences in assembly parameters. The C₄₈ condition itself accounted for almost half of the reads whatever method used, which is in accordance with the fungal growth previously reported at this stage of the infection [29,35]. The low number of reads does not allow proper quantitative comparison of fungal transcripts abundance between time-points. Thus, we focused our attention on the 40 genes cumulating a total of three reads or more with any of the two methods (Table 2). Among those, a total of 21 genes encode secreted proteins, of which 19 correspond to small secreted proteins of less than 300 amino acids, previously reported as putative candidate effectors of the poplar rust fungus [11]. Despite a very low level of fungal transcripts detected in infected leaf samples, the high number of transcripts encoding putative effectors is striking and in accordance with the levels reported in purified haustoria of other fungal biotroph [32,36] or in *M. larici-populina* biotrophy-related structures microdissected from infected poplar tissues [20]. Noteworthy, *Mlp-124067* has been reported among the most highly expressed fungal transcript at 24 hpi during the compatible poplar-poplar rust interaction [21]. The most expressed transcript (*Mlp-94736*, 92 reads) encodes a SSP of 158 amino acids with no functional annotation and only a few homologs in databases (Table 2). Strikingly, expression of the transcript is mostly explained by the I₁₈ time-point that cumulates 86 reads. *Mlp-94736* belongs to a small cluster of genes within 40 kb on the scaffold 72 of which 4 genes (*Mlp-94735*, *Mlp-94736*, *Mlp-94740* and *Mlp-94741*) were expressed in the dataset. The second most expressed transcript (*Mlp-95625*, 36 reads) encodes a SSP of 89 amino acids that possesses a short inositol phosphatase domain (conserved domain cd01640). Recent studies have reported that entry of oomycete and fungal effectors into plant

Table 1. Summary of 454-pyrosequencing transcriptome data from poplar leaves infected by *M. larici-populina*.

	I ₁₈	I ₂₁	I ₂₄	C ₁₈	C ₂₄	C ₄₈	Total
Total reads	113,884	155,204	99,033	142,092	146,231	184,856	841,301
Contig-blast method							
Assembled reads	96,078	136,186	81,330	118,783	122,352	158,776	713,505
Contigs	12,938	16,611	12,434	14,391	14,999	19,025	90,398
Poplar reads	93,107	132,086	78,396	116,052	119,217	154,631	693,489
<i>M.larici-populina</i> reads	129	43	57	36	37	347	649
Expressed <i>M. larici-populina</i> transcripts	31	26	26	27	33	265	361
Read-mapping method							
Poplar reads ^c	82,865	115,272	71,596	105,341	105,933	135,872	616,879
Expressed poplar transcripts (>1 read)	12,518	14,090	12,698	14,050	14,374	15,868	21,311 (6,755) ^a
<i>M. larici-populina</i> reads	17	13	10	12	26	281	359
Expressed <i>M. larici-populina</i> reads	15	13	9	12	24	226	280
Highly expressed (HE) poplar transcripts (≥10 reads)	2,064	2,086	2,256	2,058	2,039	2,030	978 (1,909) ^b

^aNumber of poplar transcripts expressed in all conditions.

^bNumber of poplar transcripts with an average number of 10 reads (i.e. a total of 60 reads in the 6 conditions).

^cNormalised number of reads per conditions used for quantitative analysis is 102,813 (Table S1).

doi:10.1371/journal.pone.0044408.t001

cells is mediated by binding to phosphatidylinositol phosphates (PIP) present on the extracellular face of the host plasmalemma [37–39]. The early expression of a secreted inositol phosphatase by the poplar rust fungus is puzzling and it is tempting to speculate a role related to the PIP-binding of effectors. Several genes showing homology to ribosomal proteins and elongation factors were also identified (Table 2), which is in accordance with the profile of haustoria expressed transcripts of the obligate biotrophic fungus *Golovinomyces orontii* [36]. Noticeable differences in reads numbers could be observed between the two read assignment methods, particularly for the genes cumulating the largest numbers of reads with the contig-blast method (Table 2). We manually validated the alignment of these contigs onto the *M. larici-populina* genome and their absence with the second method is due to differences in alignment parameters.

Expression of *M. larici-populina* transcripts during poplar leaf colonization (compatible interaction) and urediniospore germination was previously assessed by the mean of Genome oligoarrays [21]. Among the set of 40 fungal genes, 30 were represented on the oligoarray, of which 27 are expressed in the situations tested and particularly, 24 are expressed at 24 and 48 hpi, which provides a nice support for the transcripts detected by the 454-pyrosequencing approach. Overall, the low number of fungal transcripts detected in our study reflects the limited quantity of fungal structures in early-infected leaves [29,35]. In comparison, Fernandez and collaborators [27] identified almost one fungal for two host transcripts in the coffee-coffee rust fungus interaction, however this study targeted a late stage of infection when the fungus has completely invaded host tissues. Although providing valuable insights into early-expressed fungal transcripts, our analysis remains scale-limited and argues for the use of other NGS technologies such as Illumina for a deeper sampling of the pathogen transcriptome.

454-pyrosequencing does not Saturate the Poplar Transcriptome

A total of 616,879 reads were mapped onto 21,311 poplar transcripts (i.e. predicted protein coding genes in poplar genome),

considered as expressed when at least one read was mapped (Table 1). Among these 21,311 transcripts only 6,755 were expressed in all conditions. The average and median of total reads number per expressed transcript are 28.95 and 8 respectively, ranging from 1 to 6,513 (Fig. S4A). Saturation curves indicate that 52 ± 5 new expressed transcripts are detected for each 1000 supplemental reads after 100,000 (Fig. S4B). This demonstrates that the poplar transcriptome is not saturated and consequently unsuitable for whole-genome quantitative expression analysis. As specified recently by Malone and Oliver [40], an important concern in RNA-Seq experiments is the depth of sequencing required to efficiently sample the transcriptome. By using Illumina sequencing, Graveley and collaborators [41] reported that even 50 millions of mapped reads were not enough to fully saturate the fly-head transcriptome. Despite huge progresses in sequencing, it seems that full saturation of transcriptomes still cannot be considered as an easy purpose.

In order to isolate a subset of transcript with a sufficient coverage to enable quantitative analysis of expression, we dramatically reduced our set from 21,311 to 1,909 highly expressed (HE) transcripts, with a minimal arbitrary cut-off of 60 total reads per HE transcript (Table 1, Fig. S4).

Poplar RNA-Seq Expression Levels are Validated by Oligoarrays and RT-qPCR

In order to validate poplar RNA-Seq data, we performed whole-genome poplar oligoarrays and compared expression values gained by both methods. The DNA-chip approach detected the expression of 34,964 transcripts (76% of the coding genome) of which 31,644 were expressed in all conditions (Fig. 1a). Compared with the 21,311 expressed transcripts revealed by RNA-Seq, oligoarrays clearly demonstrate that the RNA-Seq approach was not deep enough to cover the entire poplar transcriptome. Oligoarrays confirmed the expression of 20,105 of the 21,311 transcripts detected as expressed by RNA-Seq (Fig. 1a). Among the 1,206 unconfirmed transcripts, 440 were detected below the oligoarrays background threshold whereas 766 were not spotted on the chip. Otherwise, 1,794 of the 1,909 HE transcripts were

Table 2. List of selected *M. larici-populina* (Mlp) genes expressed at early stages of poplar leaf infection and cumulating three reads for all time-points assessed in the study with any of the read assignment method.

Mlp Protein-ID ^a	reads no. with contig-blast method	reads no. with read-mapping method	Annotation notes ^b	SSP ^c	Expression notes ^d
13047	5	3	predicted secreted protein of 336 amino acids, no conserved domain	–	NA
33161	3	3	elongation factor eIF1b, predicted as secreted	yes	NA
33293	11	0	NADH:ubiquinone oxydoreductase	–	Expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 96 and 168 hpi and in urediniospores
36702	3	3	pyruvate dehydrogenase	–	Strongly expressed <i>in planta</i> at 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores and expressed at 24 hpi; peak of expression in resting urediniospores
42122	5	5	ribosomal protein S2	–	Expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting urediniospores; peaks of expression at 48 and 96 hpi and in resting urediniospores
42605	3	3	aspartate/other aminotransferase	–	Expressed <i>in planta</i> at 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression in resting urediniospores
53922	3	3	40S ribosomal protein 26S	–	Expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peak of expression at 96 hpi
70937	4	0	predicted small secreted protein of 286 amino acids with conserved rare lipoprotein A domain	yes	Expressed <i>in planta</i> at 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peak of expression in urediniospores
71305	3	0	uncharacterized conserved protein	–	Strongly expressed in resting/germinating urediniospores and expressed <i>in planta</i> at 96 and 168 hpi; peak of expression in germinating urediniospores
71396	4	0	predicted small secreted protein of 134 amino acids, no conserved domain	yes	Expressed <i>in planta</i> at 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression in germinating urediniospores
74948	3	0	elongation factor eIF2	–	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peak of expression in resting urediniospores
84328	6	3	predicted small secreted protein of 147 amino acids, no conserved domain	yes	Expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in germinating urediniospores; peak of expression at 96 hpi
85484	4	4	predicted small secreted protein of 256 amino acids, no conserved domain	yes	Strongly expressed only <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi; peaks of expression at 48 and 96 hpi
87680	5	0	predicted secreted protein of 536 amino acids with conserved ubiquitin domain	–	NA
88357	3	3	predicted small secreted protein of 163 amino acids, no conserved domain	yes	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48 and 96 hpi and expressed at 168 hpi; peaks of expression at 48 and 96 hpi
88509	4	0	hypothetical protein of 1455 amino acids, with conserved signaling SWIFT domain	–	Strongly expressed in resting/germinating urediniospores and expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi; peak of expression in germinating urediniospores
90053	12	0	hypothetical protein of 161 amino acids with zinc-finger domain	–	ND
91962	4	4	elongation factor eIF5A	–	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peak of expression at 168 hpi and in urediniospores
92704	5	0	hypothetical protein of 195 amino acids, no conserved domain	–	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 24 and 48 hpi
92712	3	0	hypothetical protein of 131 amino acids, no conserved domain	–	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48 and 96 hpi and in resting/germinating urediniospores and expressed at 168 hpi; peak of expression at 24 hpi
93158	4	4	60S ribosomal protein L10a	–	Strongly expressed <i>in planta</i> at 96 hpi and in resting urediniospores and expressed at 24, 48 and 168 hpi; peak of expression in urediniospores
93408	1	3	predicted small secreted protein of 147 amino acids, no conserved domain	yes	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48 and 96 hpi and also expressed at 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 24 and 48 hpi

Table 2. Cont.

Mlp Protein-ID ^a	reads no. with contig-blast method	reads no. with read-mapping method	Annotation notes ^b	SSP ^c	Expression notes ^d
94735	9	0	predicted small secreted protein of 95 amino acids, no conserved domain	yes	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 24 hpi
94736	92	0	predicted small secreted protein of 158 amino acids, no conserved domain	yes	NA
94740	8	0	hypothetical protein of 176 amino acids, no conserved domain	–	NA
94741	5	0	hypothetical protein of 77 amino acids, predicted transmembrane domain	–	NA
95026	3	0	hypothetical protein of 210 amino acids, no conserved domain	–	NA
95625	36	0	predicted small secreted protein of 89 amino acids with inositol polyphosphate-1-phosphatase domain	yes	NA
96323	4	0	hypothetical protein of 537 amino acids, HMG-box containing domain	–	ND
103016	3	3	predicted small secreted protein of 139 amino acids, no conserved domain	yes	Strongly expressed in planta at 24, 48 and 96 hpi and expressed at 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 24, 48 and 96 hpi
105045	3	3	predicted small secreted protein of 124 amino acids, no conserved domain	yes	Expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and slightly in germinating urediniospores; peak of expression at 96 hpi
110164	3	0	hypothetical protein of 211 amino acids, zinc-finger containing domains	–	ND
118176	3	0	hypothetical protein of 1096 amino acids, HMG-box containing domain	–	Expressed in planta at 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peak of expression in germinating urediniospores
123227	3	3	predicted small secreted protein of 124 amino acids, no conserved domain (SSP15)	yes	Strongly expressed only <i>in planta</i> at 168 hpi and slightly expressed at 24, 48 and 96 hpi; peak of expression at 168 hpi
124018	3	3	predicted small secreted protein of 156 amino acids, no conserved domain	yes	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and slightly expressed in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 48 and 168 hpi
124067	5	4	predicted small secreted protein of 285 amino acids with homology to <i>Uromyces</i> Infp differentiation protein	yes	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peak of expression at 96 hpi
124290	1	4	predicted small secreted protein of 131 amino acids, no conserved domain	yes	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48 and 96 hpi and expressed at 168 hpi and in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 48 hpi
124371	3	2	predicted small secreted protein of 89 amino acids, no conserved domain	yes	NA
124458	3	3	conserved small secreted protein of 270 amino acids, with CFEM domain	yes	Strongly expressed <i>in planta</i> at 24, 48, 96 and 168 hpi and expressed in resting/germinating urediniospores; peaks of expression at 48 and 96 hpi
124534	3	3	predicted small secreted protein of 70 amino acids, no conserved domain	yes	NA

^aProtein ID number of corresponding best gene model in the *M. larici-populina* genome sequence (JGI; <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>);

^bBased on annotation details available on the JGI website and homology searches against the non-redundant database and the conserved domain database at the NCBI;

^cpredicted small secreted protein (SSP; ≤ 300 amino acids);

^dBased on expression data reported in Duplessis et al. 2011b [21];

NA, not available on oligoarray;

ND, not detected on oligoarray.

doi:10.1371/journal.pone.0044408.t002

detected as highly-expressed on oligoarrays and are hereafter referred to as validated highly expressed (VHE) transcripts. Among the 115 non-validated HE transcripts, only 5 were detected below the threshold whereas 110 were not included in the chip design. The expression levels of the 1,794 VHE transcripts assessed by oligoarray and RNA-Seq showed a good

correlation ($r^2 = 0.37$) that increases with expression level (Fig. 1b). To further validate the RNA-Seq expression profiles, we tested 12 selected VHE transcripts by RT-qPCR. The expression profiles were in agreement with those obtained with the two other methods (Fig. S5). Otherwise, it is noteworthy to mention that 20% of the most highly expressed transcripts on oligoarrays were not

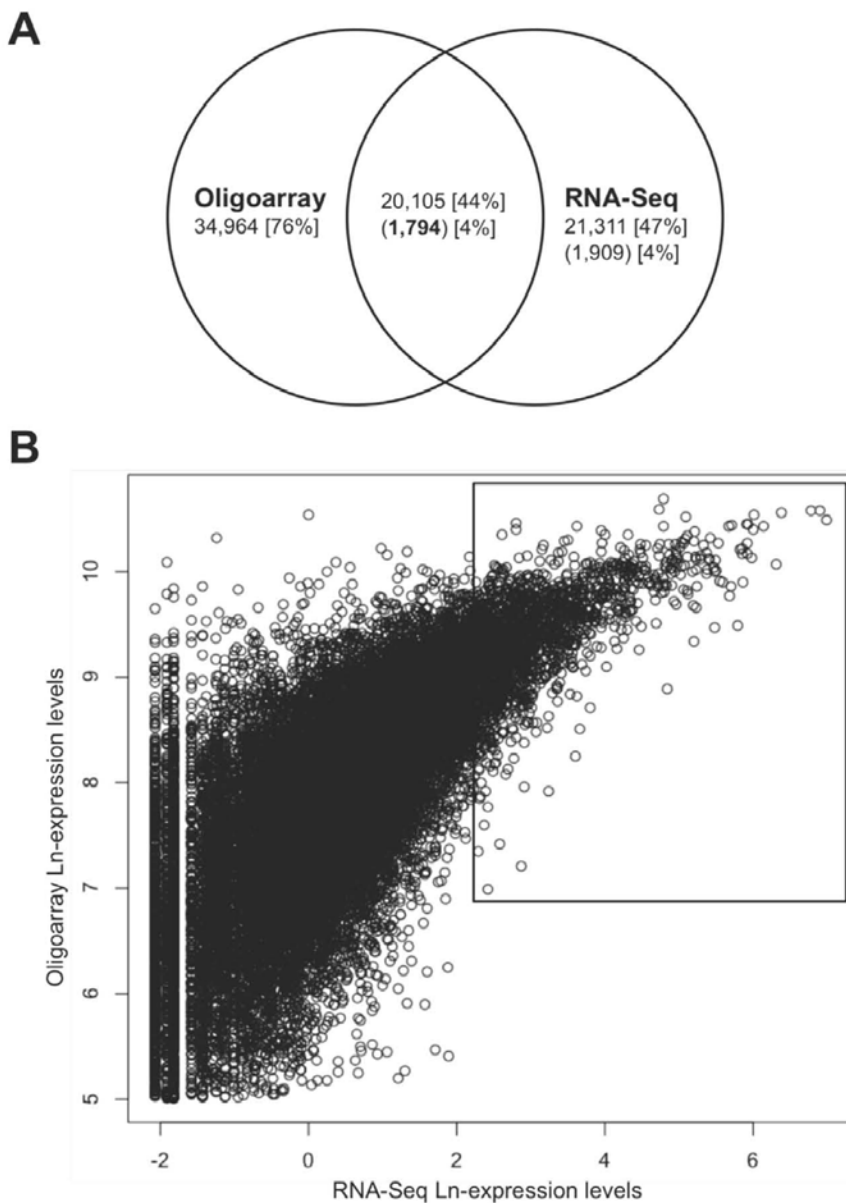


Figure 1. Ln-transformed expression levels of poplar transcripts. (A) Venn-diagram of expressed poplar transcripts measured by whole-genome oligoarray and RNA-Seq. Numbers in brackets correspond to the percentage of the coding genome; numbers in parentheses correspond to the highly expressed (HE) transcripts and numbers in parentheses and in bold correspond to HE transcripts validated by oligoarrays (i.e. VHE transcripts). (B) RNA-Seq and oligoarrays average expression levels correlation. The black rectangle indicates the area containing the 1,794 VHE transcripts discussed in the text.

doi:10.1371/journal.pone.0044408.g001

supported by RNA-Seq, revealing a unidirectional and non-negligible technical bias between these approaches discussed in Text S1 (Fig. S6).

Transcriptome of Poplar Leaves: Overall Stability at Early Stages of Infection

In order to identify early-regulated transcripts in the poplar transcriptome, expression levels were compared pair-by-pair between the 6 different conditions tested (Fig. 2). Among the VHE transcripts, 1,793 showed overall stable RNA-Seq expression levels, with average relative standard deviation percentage (%RSD, see methods) values of 35, ranging from 2 to 101 (Fig. S7a). The only highly variable transcript with a %RSD of 186 is a

predicted sulfate transporter homologous to *Arabidopsis thaliana* Sultr3;5 (AtSultr3;5) [42] and hybrid poplar *Populus tremula* x *Populus alba* Sultr3;5 (PtSultr3;5) [43] and thus was herein named *P. trichocarpa* Sultr3;5 (PtSultr3;5). The overall stability of VHE transcript expression levels was confirmed by oligoarrays, which present %RSD values from 1 to 62 (Fig. S7b). Moreover, expression levels of the 34,964 oligoarray-expressed transcripts were equally stable, with only 18 transcripts with %RSD above 100, which all correspond to low and barely expressed genes (Fig. 2, Table S1). Functional classification of the 1,794 VHE transcripts as well as detailed analysis of the stress responsive phenylpropanoid pathway further confirmed the absence of defense responses (Text S2, Fig. S8 and S9). Hence, except

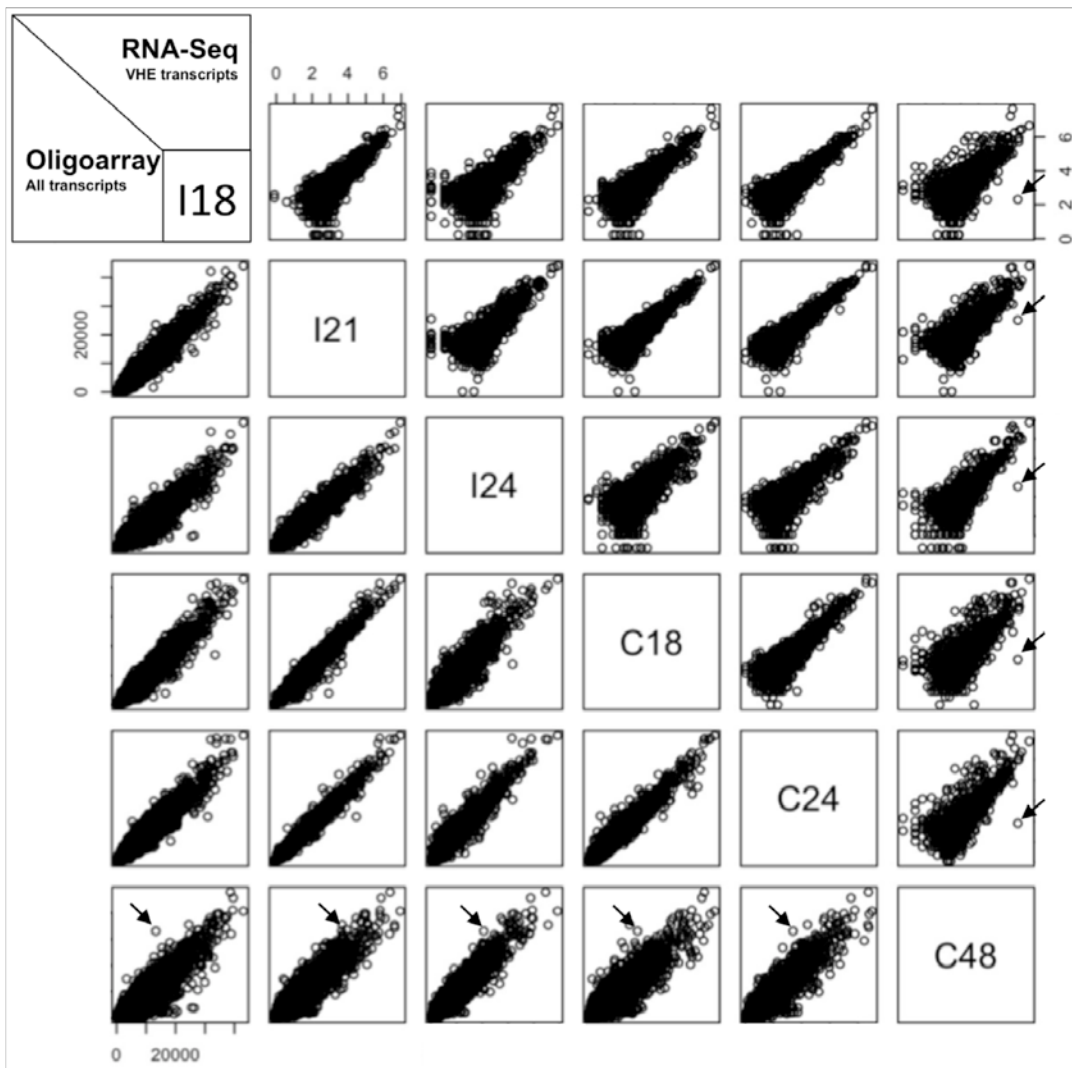


Figure 2. RNA-Seq and oligoarray two-by-two expression levels correlations along time-course infection of poplar leaves by *M. larici-populina*. Ln-transformed expression levels of the 1,794 validated highly expressed (VHE) transcripts are plotted for RNA-Seq on the up-right, and expression levels of the 34,964 transcripts detected on oligoarrays are plotted on the bottom-left. Arrows indicate values corresponding to the sulfate transporter PtSultr3;5 (Poptr_0006s16150) transcript discussed in the text. doi:10.1371/journal.pone.0044408.g002

PtSultr3;5, the leaf transcriptome remains extremely stable for the time-points investigated.

Many host transcriptomes have been reported to be highly dynamic during the first events of plant-microbe interactions [44–45], as highlighted recently in soybean leaves as early as 12 hours after inoculation by the rust fungus *Phakospora pachyrhizi* [46]. Nevertheless, in the poplar-poplar rust system, typical defense-response genes encoding pathogenesis-related (PR) proteins such as PR1 or PR5, glutathion S-transferase 18 (GST18) or the rust-induced secreted protein (RISP) are not regulated and present a basal expression at early stages of leaf infection (Table S1, [29,47]). Indeed, the first defense responses are reported at 48 hpi in the incompatible interaction, concomitant with an arrest of *M. larici-populina* avirulent strain progression in leaves [28–29]. Considering the global stability of the poplar transcriptome and the fact that sulfate transporters are not reported as typical defense-related genes in the literature, we conclude that no defense responses could be detected in early rust-infected poplar leaves.

A Poplar Sulfate Transporter is Specifically Induced by the Rust Fungus

The sulfate transporter *PtSultr3;5* displayed the highest %RSD among all VHE transcripts (Fig. S7). Interestingly, the variability observed is explained by the condition C₄₈ (515 reads) with an almost 20-fold up-regulation compared with the other five conditions that remain stable (26 ± 15 reads) (Table S1). The different methods used in this study to quantify gene expression provided highly similar profiles for this gene, validating its effective regulation (Fig. 3a). Moreover, complementary infection time-points included in the RT-qPCR assay, as well as comparison to mock-inoculated control leaves, provided a more accurate expression pattern (Fig. 3b). A strong induction of *PtSultr3;5* was observed at 48 hpi in both compatible and incompatible poplar-poplar rust interactions compared with all other conditions that showed an overall stable expression. Thus, *PtSultr3;5* presents a fungal-specific strain-independent induction in poplar leaves. Since we did not detect neither defense responses nor large-scale transcriptome regulations, and consid-

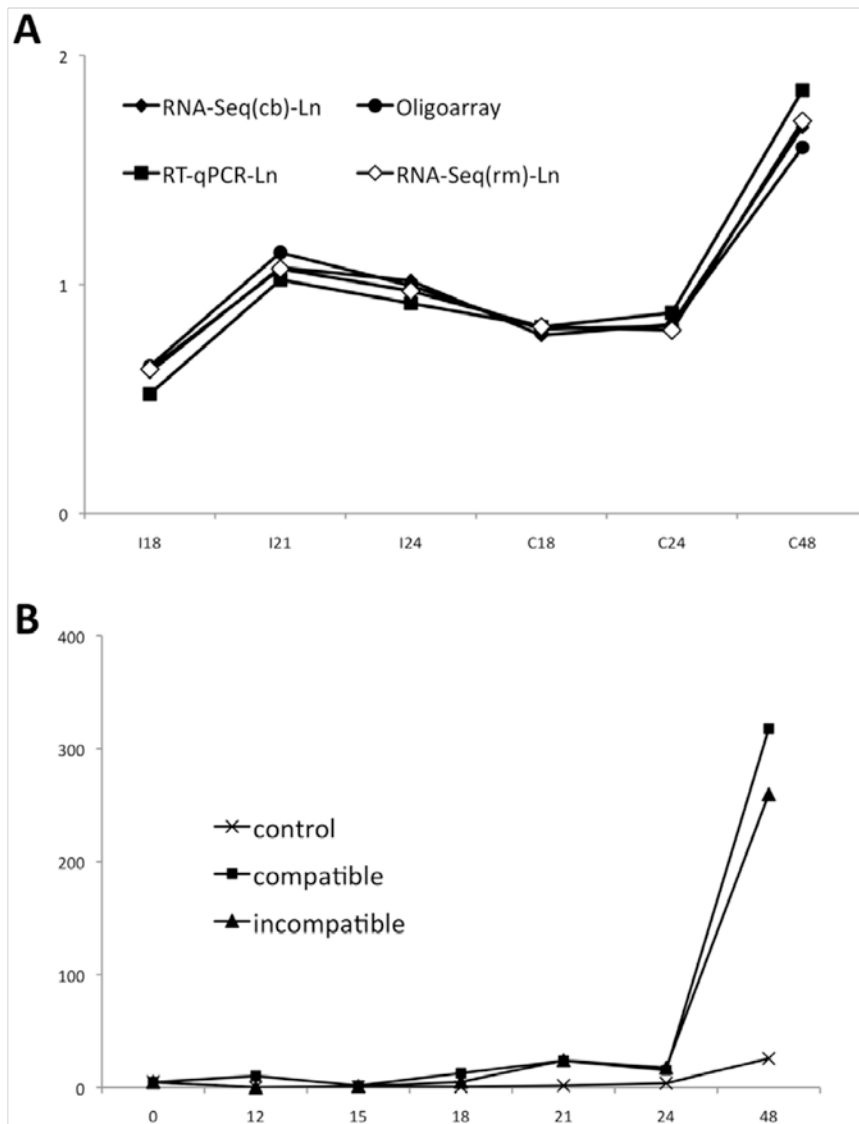


Figure 3. Expression profile of *PtSultr3;5*. (A) Expression pattern of *PtSultr3;5* (Poptr_0006s16150) assessed by oligoarray, RT-qPCR and RNA-Seq. RNA-Seq and RT-qPCR values are Ln-transformed. For RNA-Seq, both results from the contig-blast (cb) and the read-mapping (rm) methods are presented. Values are in arbitrary units. (B) Detailed RT-qPCR profile of *PtSultr3;5* between 0 and 48 hours post-inoculation (hpi). Expression values are normalized to the ubiquitin reference gene expression (see methods). doi:10.1371/journal.pone.0044408.g003

ering the specificity and amplitude of the induction of *PtSultr3;5*, we hypothesized that this specific up-regulation could result from a pathogen manipulation.

PtSultr3;5 is the ortholog of *AtSultr3;5* (At5g19600) that belongs to the family of low-affinity sulfate transporter and is localized at plasma membranes [48]. Interestingly, *PtSultr3;5* is also the ortholog of the *Lotus japonicus* symbiotic sulfate transporter 1 (SST1) with 57% of identity (Fig. S10). In *L. japonicus* intracellular rhizobia symbiotic interactions, SST1 is located onto the symbiosome membrane, the interface for host-symbiont nutrient exchanges [49]. Moreover, Krusell and colleagues [50] demonstrated that *sst1* expression is nodule-specific and that a mutant lacking *sst1* was defective for symbiosis. The authors concluded that SST1 is essential for symbiosis, likely by translocating sulfate from the host cell to the symbiont. Interestingly, Felten and collaborators [51] reported that *PtSultr3;5* is one of the 15 most induced transcripts in poplar roots during early interaction with

the symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. In these experiments, the host and its symbiont were not in contact, suggesting that indirect and diffusible signals were directly or indirectly responsible of host-transcriptome reprogramming.

No obvious link has been established so far between host sulfur metabolism and mechanisms of pathogenicity in biotrophs. However, in a recent groundbreaking study, Mukhtar and collaborators [52] showed that multiple effectors from divergent biotroph pathogens target response to low sulfur proteins 1 and 2 (LSU1 and LSU2). As mentioned by the authors, the identification of sulfur-related proteins as conserved targets of effectors is puzzling since one of the hallmarks of biotrophy is the loss of key genes necessary to assimilate sulfur. Indeed, this has been reported for several biotroph pathogens belonging to distinct phyla such as the oomycete *Hyaloperonospora arabidopsidis*, the ascomycete *Blumeria graminis* and the basidiomycete *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* [9,17,53–54]. In the case of *M. larici-populina*, genes required to perform the

primary sulfate assimilation were nevertheless identified, although a transketolase domain of the beta-subunit of the sulfide reductase is missing [17]. Interestingly, 2 out of 3 *M. larici-populina* sulfate transporter transcripts are expressed during poplar leaf infection and in urediniospores, however sulfate metabolism transcripts are barely detected [21].

It is tempting to speculate that *M. larici-populina* could perform a targeted-manipulation of poplar physiology by inducing *PtSultr3;5* to derivate sulfate via a host-encoded mechanism. Such a manipulation of host transporter expression by pathogens has been described in interactions between *Xanthomonas* spp. and rice or pepper, where host genes encoding sugar transporters are specifically and necessarily induced by transcription activator-like (TAL) bacterial effectors to settle compatibility [55–57]. Interestingly, fungal pathogens also induce sugar exporters during plant infection [57] and although effectors have been brought up, the molecular mechanism underpinning this phenomenon remains to be determined [58]. To our knowledge, no TAL effectors have been reported outside of the bacterial genus *Xanthomonas* and *Ralstonia*. Interestingly, a recent report by Plett and colleagues [14] has shown that a small-secreted effector protein from the symbiotic fungus *L. bicolor* targets the host nucleus to settle compatibility through poplar roots transcriptome modulation. Moreover, in plant-oomycete interactions, the massive delivery of effector proteins into the host nucleus has been observed [15,59]. Altogether, these studies raise interesting perspectives on the ability of biotrophic eukaryote plant symbionts to perform targeted modulations of host genetic programs.

Conclusions

In this study, we performed a transcriptome analysis of early stages of poplar leaf infection by the rust fungus *M. larici-populina* both during compatible and incompatible interactions. We covered critical steps of the fungus biotrophic growth in the host, when the first haustorial structures are formed ahead of typical host defense responses. Complementary large-scale expression approaches were used including 454 pyrosequencing and oligoarrays to assess the accuracy of the expression data. At these early stages, only a few fungal transcripts were detected *in planta* indicating that 454-pyrosequencing could not support investigation of fungal function. Nevertheless, early-expressed candidate effectors corresponding to probable rust pathogenicity determinants were detected and will be targeted in future investigations. We report the absence of induction of typical defense response genes in infected poplar leaves before 48 hpi, which is contrasted by a highly induced poplar sulfate transporter. This last observation, in the light of our knowledge of biotrophy, is puzzling and establishes a new correlative link between biotrophic growth and host sulfate. *PtSultr3;5* is also early induced in poplar roots upon indirect interaction with a symbiotic fungus (i.e. pre-symbiotic contact) and could represent a conserved mechanism targeted by symbiotic and pathogenic biotrophs to settle compatibility with poplar. Further functional investigations are now needed to understand the role of *PtSultr3;5* and more generally to underpin how plant sulfate transport could play a role in plant-microbe interactions.

Materials and Methods

Biological Material, Infection Procedures and Time-course Infection

Melampsora larici-populina isolates 98AG31 (pathotype 3-4-7) and 93ID6 (pathotype 3-4), respectively virulent and avirulent on the

hybrid *P. trichocarpa* × *P. deltoides* poplar cultivar ‘Beaupré’, were used in this study. Urediniospores multiplication and poplar leaf inoculation procedures were carried out as previously described [29] except that inoculations were performed on 5 cm² leaf disks as reported in other studies [60–62]. For time-course infection analyses, leaf disks were harvested at 0, 12, 15, 18, 21, 24 and 48 hpi in compatible (C) and incompatible (I) interactions as well as in mock-inoculated (water agar) condition (T). The 6 following conditions were used for 454-pyrosequencing and oligoarrays: I₁₈, I₂₁, I₂₄, C₁₈, C₂₄, C₄₈ (Fig. S1). All of these conditions were used for RT-qPCR analyses. No biological duplication was performed.

RNA Extraction and cDNA Preparation

Total RNA extraction and quantity/quality control were performed as previously described [29]. For 454-pyrosequencing and oligoarray experiments, tagged double-strands (ds) cDNA were synthesized with the SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France), following manufacturer instructions, with 0.5 µg of starting total RNA and 19 cycles of PCR amplification in 25 µL. PCR products were purified with the Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Couteboeuf, France), quantified with a nanodrop 1000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France) and their quality was assessed by electrophoretic RNA profiling with an Experion analyzer using the Experion RNA Standard-Sens analysis kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). For RT-qPCR experiments, cDNA were synthesized using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad,) with 1 µg of total RNA and following manufacturer instructions.

454-pyrosequencing and Oligoarrays

Sequences were generated from 5 µg of full-length cDNA using the 454-GS-FLEX Titanium pyrosequencing technology on a Roche 454 Titanium sequencer (single read strategy) at the CEA-Genoscope (Centre National de Séquençage, Evry, France; <http://www.genoscope.cns.fr/spip>) following standard procedures recommended by Roche. Two half-plates were used: one for the I₁₈, I₂₁, I₂₄ conditions mixed 1/3-1/3-1/3 together with specific tags; and another one for the C₁₈, C₂₄, C₄₈ conditions mixed 1/3-1/3-1/3 together with specific tags. Raw 454-sequences are available upon request. The interest and use of 454-sequences for complementary annotation of poplar and poplar rust genomes are discussed in Text S3. Whole-genome poplar oligoarrays were generated and hybridized at the NimbleGen facilities (NimbleGen systems, Reykjavik, Iceland) following standard protocols [29,51]. Microarray probe intensities were quantile normalized across chips, using the Arraystar software (DNAStar, Inc., Madison, WI, USA). The background level was fixed at 150 (average 3-fold random probe intensities across oligoarray hybridizations). The complete oligoarray expression datasets are available at the NCBI GEO website as series number GSE34802.

RT-qPCR

Specific primers were designed for targeted ‘Beaupré’ transcripts and RT-qPCR were carried out as previously detailed on technical duplicates [20]. Sequences gained by RNA-Seq were used for primer design in order to avoid polymorphism bias during alleles amplifications of the ‘Beaupré’ hybrid cultivar. Transcript expression was normalized to the poplar ubiquitin reference transcript [29] and calculated using the following equation: Relative Expression = [(target gene primer efficiency)^{-C_t}] / [(reference gene primer efficiency)^{-C_t}], where C_t is the number

of PCR amplification cycles necessary for signal detection [63]. Primer sequences are presented in Table S2.

Bioinformatic Procedures for RNA-Seq Data Analysis

Raw reads were processed to remove SmartER adaptor sequences and reads shorter than 70 pb were discarded. For the contig-blast method, reads were assembled into contigs with the Mimicking Intelligent Read Assembly (MIRA) program [64] and blast homology searches were performed against both *M. larici-populina* (version 1.0, JGI website <http://genome.jgi-psf.org/Mellp1/>) and *P. trichocarpa* (version 2.2, Phytozome website <http://www.phytozome.net/poplar>) genome sequences. Contigs were assigned to the reference genomes based on blast scores and e-values, and ambiguous assignments were eventually resolved by searching for plant or fungal homologs in international databases as previously described [27]. All assignments were validated by genome assignments with GenomeThreader [65]. For the read-mapping method, reads were aligned directly on *P. trichocarpa* and *M. larici-populina* genome sequences using Program to Assemble Spliced Alignments (PASA, [34], <http://pasa.sourceforge.net/>) with default parameters and GMAP as the program to align transcripts and annotated coding sequences available at the *P. trichocarpa* and *M. larici-populina* genomes websites. PASA included *de novo* assembly on the genome considering available annotations and proposed predictions for gene correction, gene creation as well as identification of putative splicing variants (see Text S3). Numbers of reads attributed to annotated genes at the six time-points were retrieved using in-house scripts and reads' numbers were normalized between the six conditions prior further quantitative comparisons (Table 1). Expression analyses and graphics were done with Excel for Mac (Microsoft) or R version 2.9.2 (<http://cran.r-project.org/>). For a given transcript, %RSD of the six expression values was calculated according to the following equation: $\%RSD = [(standard\ deviation/average) \times 100]$. Sequences were analyzed in Text Wrangler version 2.3 (Bare Bones Software, Inc.) and Tablet version 1.10.05.21 [66]. Alignments were performed with the Multalin online software (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). The Functional Catalogue (FunCat) version 2.1 was used for classification of genes with slight modifications within categories [67]. Read and contig sequences as well as PASA outputs (i.e. gene model re-annotation as well as identification of alternative splicing and of allelic polymorphism) are available upon request. Saturation curves were performed with Analytic Rarefaction software version 2.0 (<http://www.huntmountainsoftware.com/>).

Supporting Information

Figure S1 Experimental design and bioinformatic procedure summary. (A) Experimental design of the time-course infection. All conditions and time-points were used for standard cDNA synthesis and subsequent RT-qPCR, whereas the 6 conditions highlighted in black (I₁₈, I₂₁, I₂₄, C₁₈, C₂₄, C₄₈) were used for hybridization on poplar oligoarrays and for tagged cDNA synthesis and subsequent 454-pyrosequencing as depicted in b. (B) Summary of the bioinformatic procedure and analyses performed in the study. (TIF)

Figure S2 Read and contig length distribution. (TIF)

Figure S3 RNA-Seq data analysis methods comparison. RNA-Seq mean expression levels are Ln-transformed. (TIF)

Figure S4 RNA-Seq coverage of the poplar transcriptome. (A) Distribution of RNA-Seq reads among the 21,311 expressed poplar transcripts. The black rectangle highlights the subset of 1,909 highly expressed (HE) transcripts considered for quantitative analyses. (B) Average saturation curve of the poplar transcriptome by RNA-Seq. (TIF)

Figure S5 Correlation between RNA-Seq, oligoarrays and RT-qPCR normalized expression levels for 12 selected validated highly expressed (VHE) transcripts (listed in Table S2). (TIF)

Figure S6 Dot-plot of the 285 most-expressed transcripts on oligoarrays (average expression values above 20,000) and corresponding RNA-Seq expression values. (TIF)

Figure S7 Percentage-relative standard deviation (%RSD) distributions. (A) %RSD for RNA-Seq expression levels of the 1,794 validated highly expressed (VHE) transcripts. (B) %RSD of oligoarray expression levels of the 1,794 VHE transcripts. Arrows in (A) and (B) indicate values of the fungal-induced sulfate transporter (*PtSultr3;5*, Poptr_0006s16150). (TIF)

Figure S8 Functional Catalogue (FunCat) classification of the 1,794 validated highly expressed (VHE) transcripts. (A) Distribution of FunCat categories. Values represent percentage of the 1,794 VHE transcripts. (B) Average expression levels in FunCat categories. (C) Average percentage-relative standard deviation (%RSD) in FunCat categories. (TIF)

Figure S9 Transcriptional levels of the phenylpropanoid pathway transcripts in poplar leaves infected by *M. larici-populina*. (TIF)

Figure S10 Alignment of selected plant sulfate transporters homologous to *PtSultr3;5*. Amino acid sequences of *PtSultr3;5* (*Populus trichocarpa*, POPTR_0006s16150.1), Beaupré-9 (contig C48-lrc9, *P. trichocarpa* x *Populus deltoides* 'Beaupré'), Beaupré-124 (contig C48-lrc-124, *P. trichocarpa* x *P. deltoides* 'Beaupré'), *AtSultr3;5* (*Arabidopsis thaliana*, At5g19600), NCBI ID 117557144 (*PtaSultr3;5*, *Populus tremula* x *Populus alba*), NCBI ID 255549068 (*Ricinus communis*), NCBI ID 225445290 (*Vitis vinifera*), NCBI ID 45720463 (*Brassica oleracea*), NCBI ID 297812143 (*Arabidopsis lyrata*) and SST1 (*Lotus japonicus*). Asterisks indicate polymorphic residues between 'Beaupré' alleles and the double-head arrow marks additional predicted amino acids in the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome discussed in Test S3. (TIF)

Table S1 Summary table of expression, annotation and sequence data used in the study for poplar genes. (ZIP)

Table S2 List of primers used in this study. (XLS)

Text S1 Uncorrelated oligoarray/RNA-Seq transcript expression. (DOC)

Text S2 Functional classification of the 1,794 poplar validated highly expressed (VHE) genes. (DOC)

Text S3 Interest and use of 454-sequences for complementary annotation of poplar and poplar rust genomes. (DOC)

Acknowledgments

The authors thank Patrice Vion, Jean-louis Churin and Olivier Cael (INRA Nancy) for technical support and advices on poplar culture in greenhouses; Pascal Frey and Bénédicte Fabre (INRA Nancy) for the access to the *M. larici-populina* strains collection and discussions on the poplar-poplar rust pathosystem; Aurore Coince (INRA Nancy) for advices on R

References

- Schulze-Lefert P, Panstruga R (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Sci* 16: 117–125.
- Hok S, Attard A, Keller H (2010) Getting the Most from the Host: How Pathogens Force Plants to Cooperate in Disease. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1253–1259.
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539–548.
- Nirmala J, Draeher T, Chen X, Steffenson B, Kleinhofs A (2010) Stem rust spores elicit rapid RRG1 phosphorylation. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1635–1642.
- Schneider DJ, Collmer A (2010) Studying Plant–Pathogen Interactions in the Genomics Era: Beyond Molecular Koch's Postulates to Systems Biology. *Annu Rev Phytopathol* 48: 457–479.
- Panstruga R, Dodds PN (2009) Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. *Science* 324: 748–750.
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM (2009) Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47: 233–263.
- Jonge (de) R, Bolton MD, Thomma BPHJ (2011) How filamentous pathogen co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr Opin Plant Biol* 14: 1–7.
- Schmidt SM, Panstruga R (2011) Pathogenomics of fungal plant parasites: what have we learnt about pathogenesis? *Curr Opin Plant Biol* 14: 1–8.
- Duplessis S, Joly DL, Doods PN (2012) Rust effectors. In: Martin F, Kamoun S, editors. *Effectors in Plant-Microbe Interactions* (1st edition). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 155–193.
- Hacquard S, Joly DL, Lin Y-C, Tisserant E, Feau N, et al. (2012) A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol Plant Microbe Interact* doi:10.1094/MPMI-09-11-0238.
- Block A, Alfano JR (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol* 14: 39–46.
- Koeck M, Hardham AR, Dodds PN (2011) The role of effectors in biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell Microbiol* 13: 1847–1859.
- Plett JM, Kempainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, et al. (2011) A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Curr Biol* 21: 1197–1203.
- Caillaud M-C, Piquerez SJM, Fabro G, Steinbrenner J, Ishaque N, et al. (2012) Subcellular localization of the *Hpa* RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *Plant J* 69: 252–265.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596–1604.
- Duplessis S, Cuomo CA, Lin Y-C, Aerts A, Tisserant E, et al. (2011a) Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* doi/10.1073/pnas.1019315108.
- Hacquard S, Petre B, Frey P, Hecker A, Rouhier N, et al. (2011a) The Poplar-Poplar Rust Interaction: Insights from Genomics and Transcriptomics. *Journal of Pathogens* doi:10.4061/2011/716041.
- Duplessis S, Major I, Martin F, Séguin A (2009) Poplar and Pathogen Interactions: Insights from *Populus* Genome-Wide Analyses of Resistance and Defense Gene Families and Gene Expression Profiling. *Crit Rev Plant Sci* 28: 309–334.
- Hacquard S, Delaruelle C, Legué V, Tisserant E, Kohler A, et al. (2010) Laser Capture Microdissection of Uredinia Formed by *Melampsora larici-populina* Revealed a Transcriptional Switch Between Biotrophy and Sporulation. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1275–1286.
- Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P, et al. (2011b) *Melampsora larici-populina* Transcripts Profiling During Germination and Time-course Infection of Poplar Leaves Reveals Dynamic Expression Patterns Associated with Virulence and Biotrophy. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 808–818.
- Rothberg JM, Leamon JH (2008) The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol* 26: 1117–1124.
- Simon SA, Zhai J, Nandety RS, McCormick KP, Zeng J, et al. (2009) Short-Read Sequencing Technologies for Transcriptional Analyses. *Annu Rev Plant Biol* 60: 305–333.

graphical tools and saturation curves design; Diana Fernandez for fruitful discussions in the course of the collaboration on plant-rust fungi transcriptome analyses (collaborative CEA-Génoscope/INRA/IRD sequencing project).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BP SD. Performed the experiments: BP SH CD CDS JP. Analyzed the data: BP EM ET SD. Contributed reagents/materials/analysis tools: FM AK. Wrote the paper: BP SH FM NR SD.

- Metzker ML (2010) Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 11: 31–46.
- Kemen E, Gardiner A, Schultz-Larsen T, Kemen AC, Balmuth AL, et al. (2011) Gene Gain and Loss during Evolution of Obligate Parasitism in the White Rust Pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *Plos Biol* 9(7): e1001094.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, et al. (2011) The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol* doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03948.x.
- Fernandez D, Tisserant E, Talhinhos P, Azinheira H, Vieira A, et al. (2012) 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals *in planta*-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Mol Plant Pathol* 5: 515–595.
- Laurans F, Pilate G (1999) Histological Aspects of a Hypersensitive Response in Poplar to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology* 89: 223–238.
- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, et al. (2007) Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiol* 144: 347–366.
- Hahn M, Mendgen K (1997) Characterization of In Planta-Induced Rust Genes Isolated from a Haustorium-Specific cDNA Library. *Mol Plant Microbe Interact* 4: 427–437.
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, et al. (2005) Identification of a Protein from Rust Fungi Transferred from Haustoria into Infected Plant Cells. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1030–1039.
- Catanzari A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG (2006) Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18: 243–256.
- Rafiqi M, Gan PHP, Ravensdale M, Lawrence GJ, Ellis JG, et al. (2010) Internalization of Flax Rust Avirulence Proteins into Flax and Tobacco Cell Can Occur in the Absence of the Pathogen. *Plant Cell* 22: 2017–2032.
- Haas BJ, Delcher AL, Mount SM, Wortman JR, Smith RK, et al. (2003) Improving the Arabidopsis genome annotation using maximal transcript alignment assemblies. *Nucl Acid Res* 31: 5654–5666.
- Hacquard S, Veneault-Fourrey C, Delaruelle C, Frey P, Martin F, et al. (2011b) Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for *in planta* RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* 75: 106–112.
- Weßling R, Schmidt SM, Micali CO, Knaust F, Reinhardt R, et al. (2012) Transcriptome analysis of enriched *Colovinomyces orontii* haustoria by deep 454 pyrosequencing. *Fung Genet Biol*, doi:10.1016/j.fgb.2012.04.001.
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, Dou D, Feldman E, et al. (2010) External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell* 142: 284–295.
- Kale SD, Tyler BM (2011) Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. *Cell Microbiol* 13: 1839–1848.
- Yaeno T, Li H, Chaparro-García A, Schornack S, Koshiba S, et al. (2011) Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* doi/10.1073/pnas.1106002108.
- Malone JH, Oliver B (2011) Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol* 9: 34.
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, et al. (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471: 473–479.
- Kumar S, Hasan Asif M, Chakrabarty D, Deo Tripathi R, Kumar Trivedi P (2011) Differential expression and alternative splicing in rice sulphate transporter family members regulate sulphur status during plant growth, development and stress conditions. *Funct Integr Genomic* doi: 10.1007/s10142-010-0207-y.
- Dürr J, Bücking H, Mult S, Wildhagen H, Palme K, et al. (2010) Seasonal and cell type specific expression of sulfate transporters in the phloem of *Populus* reveals tree specific characteristics for SO₄²⁻ storage and mobilization. *Plant Mol Biol* 72: 499–517.
- Wise RP, Moscou MJ, Bogdanove AJ, Whitham SA (2007) Transcript Profiling in Host-Pathogen Interactions. *Annu Rev Phytopathol* 45: 329–369.
- Zipfel C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 12: 414–420.

46. Schneider KT, van de Mortel M, Bancroft TJ, Braun E, Nettleton D, et al. (2011) Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. *Plant Physiol* 157: 355–371.
47. Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biol* 11: 33.
48. Kataoka T, Hayashi N, Yamaya T, Takahashi H (2004) Root-to-Shoot Transport of Sulfate in Arabidopsis. Evidence for the Role of SULTR3;5 as a Component of Low-Affinity Sulfate Transport System in the Root Vasculature. *Plant Physiol* 136: 4198–4204.
49. Wienkoop S, Saalbach G (2003) Proteome analysis: Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiol* 131: 1080–1090.
50. Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kramer U, et al. (2005) The Sulfate Transporter SST1 Is Crucial for Symbiotic Nitrogen Fixation in *Lotus japonicus* Root Nodules. *Plant Cell* 17: 1625–1636.
51. Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, et al. (2009) The Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* Stimulates Lateral Roots Formation in Poplar and Arabidopsis through Auxin Transport and Signaling. *Plant Physiol* 151: 1991–2005.
52. Mukhtar MS, Carvunis A-R, Dreze M, Epple P, Steinbrenner J, et al. (2011) Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. *Science* 333: 596–601.
53. Baxter L, Tripathy S, Ishaque N, Boot N, Cabral A, et al. (2010) Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science* 330: 1549–1551.
54. Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, et al. (2010) Genome Expansion and Gene Loss in Powdery Mildew Fungi Reveal Tradeoffs in Extreme Parasitism. *Science* 330: 1543–1546.
55. Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, et al. (2010) Rice *xa13* Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene *Os-11N3*. *Plant Cell* 22: 3864–3876.
56. Boch J, Bonas U (2010) Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu Rev Phytopathol* 48: 419–436.
57. Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, et al. (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468: 527–532.
58. Talbot NJ (2010) Raiding the sweet shop. *Nature* 468: 468–469.
59. Schornack S, van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M, et al. (2010) Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 17421–17426.
60. Dowkiw A, Husson C, Frey P, Pinon J, Bastien C (2003) Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology* 93: 421–427.
61. Boyle B, Hamelin RC, Séguin A (2005) In vivo monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR. *Appl Environ Microbiol* 71: 1546–1552.
62. Boyle B, Levée V, Hamel L-P, Nicole M-C, Séguin A (2010) Molecular and histochemical characterisation of two distinct poplar *Melampsora* leaf rust pathosystems. *Plant Biol* 12: 364–376.
63. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acid Res* 29: 2003–2007.
64. Chevreux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Muller WEG, et al. (2004) Using the miraEST Assembler for Reliable and Automated mRNA Transcript Assembly and SNP Detection in Sequenced ESTs. *Genome Res* 14: 1147–1159.
65. Gremme G, Brendel V, Sparks ME, Kurtz S (2005) Engineering a software tool for gene structure prediction in higher organisms. *Inform Software Technol* 47: 965–978.
66. Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, et al. (2010) Tablet – next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* 26: 401–402.
67. Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, et al. (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucl Acid Res* 32: 5539–5545.
68. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y (2008) RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 18: 1509–1517.
69. Tsai C-J, Harding SA, Tschaplinski TJ, Lindroth RL, Yuan Y (2006) Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. *New Phytol* 172: 47–62.
70. Hamberger B, Ellis M, Friedmann M, de Azevedo Souza C, Barbazuk B, et al. (2007) Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families. *Can J Bot* 85: 1182–1201.
71. Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, et al. (2007) The Transcriptional Response of Hybrid Poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to Infection by *Melampsora medusae* Leaf Rust Involves Induction of Flavonoid Pathway Genes Leading to the Accumulation of Proanthocyanidins. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 816–831.
72. Azaiez A, Boyle B, Levée V, Séguin A (2009) Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 190–200.

CHAPITRE III

Analyse génomique des thaumatin-like proteins chez le peuplier

Résumé du chapitre III

Analyse génomique des thaumatin-like proteins (TLP) de peuplier

L'analyse des premiers génomes de plantes séquencés a révélé la présence de nombreuses familles multigéniques. L'analyse détaillée de ces familles a permis d'en retracer l'évolution et la diversification, souvent associées à de la néo-fonctionnalisation, comme cela a notamment pu être mis en évidence pour certains gènes impliqués dans la résistance aux pathogènes. Les thaumatin-like proteins (TLP) appartiennent à une famille de protéines aux propriétés antimicrobiennes, impliquées dans les réponses de défense des plantes. Elles constituent la cinquième famille des pathogenesis-related proteins (PR-5). La famille des TLP est plus grande chez le peuplier que chez les autres organismes analysés et l'expression de nombreux transcrits est fortement induite lors de l'interaction incompatible avec *M. larici-populina*.

Ce projet avait pour objectif une annotation de la famille des TLP chez le peuplier, associée à une étude plus exhaustive chez les plantes dont la séquence génomique était disponible en 2010, ainsi que les TLP des eucaryotes pour lesquels des données fonctionnelles étaient disponibles. Entre autre, cette analyse a montré que seuls certains groupes phylogénétiques de TLP sont régulés lors des réponses de défense chez le peuplier, ce qui suggère que d'autres clades peuvent avoir d'autres fonctions, par exemple liées au développement. De manière intéressante, quatre TLP de peuplier présentent un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine kinase prédit cytoplasmique, ce qui suggère que ces protéines ont pu évoluer vers des fonctions de signalisation, comme des récepteurs immunitaires à la surface des cellules. En corrélant les différentes fonctions décrites pour l'ensemble des TLP eucaryotes, nous avons montré que les deux dénominations TLP et osmotin-like proteins (OLP, Osmotin étant le nom d'une TLP identifiée chez le tabac) couramment observées dans la littérature ne sont justifiées ni par la phylogénie ni par l'existence de fonctions différentes et nous recommandons dorénavant d'adopter uniquement l'appellation TLP.

Ce chapitre de thèse est composé d'un article de recherche rédigé en anglais et intitulé '**Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar**', publié dans la revue 'BMC Plant Biology' le 15 février 2011 et dont je suis le premier auteur. La compilation des données transcriptomiques relatives aux interactions peuplier-*Melampsora* spp. a été réalisée en collaboration avec Ian Major (alors post-doctorant dans le groupe d'Armand Séguin au Centre de Foresterie des Laurentides au Québec, puis à l'Université du Michigan aux Etats-Unis).

Un article court de synthèse en français et intitulé '**Les apports de la génomique pour l'étude des familles multigéniques : exemple des thaumatin-like proteins (TLPs) chez le peuplier**' est disposé en Annexes. Cet article dont je suis premier auteur a été publié dans les 'Actes du séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E' le 20 janvier 2011. La rédaction et la publication d'un article en français dans les actes de ce séminaire annuel est requis pour tous les doctorants de l'Ecole Doctorale RP2E. Dans cet article, l'analyse des TLP présentée dans ce chapitre à été replacée dans un contexte plus large, en soulignant comment les progrès rapides de la génomique ont permis des avancées majeures dans la compréhension des processus biologiques et évolutifs des familles multigéniques chez les plantes.

Article n° 3 : Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar

Benjamin Petre, Ian Major, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

Article publié le 15 février 2011 dans la revue 'BMC Plant Biology'
doi:10.1186/1471-2229-11-33

Dix fichiers de matériel supplémentaire sont disponibles sur le site Internet de BMC Plant Biology

<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/33>

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar

 Benjamin Petre¹, Ian Major², Nicolas Rouhier¹, Sébastien Duplessis^{1*}

Abstract

Background: Plant inducible immunity includes the accumulation of a set of defense proteins during infection called pathogenesis-related (PR) proteins, which are grouped into families termed PR-1 to PR-17. The PR-5 family is composed of thaumatin-like proteins (TLPs), which are responsive to biotic and abiotic stress and are widely studied in plants. TLPs were also recently discovered in fungi and animals. In the poplar genome, TLPs are over-represented compared with annual species and their transcripts strongly accumulate during stress conditions.

Results: Our analysis of the poplar TLP family suggests that the expansion of this gene family was followed by diversification, as differences in expression patterns and predicted properties correlate with phylogeny. In particular, we identified a clade of poplar TLPs that cluster to a single 350 kb locus of chromosome I and that are up-regulated by poplar leaf rust infection. A wider phylogenetic analysis of eukaryote TLPs - including plant, animal and fungi sequences - shows that *TLP* gene content and diversity increased markedly during land plant evolution. Mapping the reported functions of characterized TLPs to the eukaryote phylogenetic tree showed that antifungal or glycan-lytic properties are widespread across eukaryote phylogeny, suggesting that these properties are shared by most TLPs and are likely associated with the presence of a conserved acidic cleft in their 3D structure. Also, we established an exhaustive catalog of TLPs with atypical architectures such as small-TLPs, TLP-kinases and small-TLP-kinases, which have potentially developed alternative functions (such as putative receptor kinases for pathogen sensing and signaling).

Conclusion: Our study, based on the most recent plant genome sequences, provides evidence for *TLP* gene family diversification during land plant evolution. We have shown that the diverse functions described for TLPs are not restricted to specific clades but seem to be universal among eukaryotes, with some exceptions likely attributable to atypical protein structures. In the perennial plant model *Populus*, we unravelled the TLPs likely involved in leaf rust resistance, which will provide the foundation for further functional investigations.

Background

Plants respond to challenge from pathogens by activating an inducible protein-based defense system that includes 17 families of pathogenesis-related (PR) proteins termed PR-1 to PR-17 [1,2]. Proteins of the PR-5 family have high sequence identity with thaumatin, which are sweet-tasting proteins isolated from the West African shrub *Thaumatococcus daniellii* and are thus referred to as thaumatin-like proteins (TLPs) [3]. For decades, TLPs have been studied extensively in plants

for their antifungal properties. The recent identification of TLPs in animals [4] and fungi [5] indicates that these proteins are more widely distributed and not only restricted to plants [6].

Molecular studies of TLP expression, localisation and activity support a role for TLPs in host defense during pathogen infection. TLP up-regulation has been described in many higher plants infected by pathogens such as bacteria, oomycetes and fungi [7,8]. Localisation studies revealed that plant pathogen-inducible TLPs are secreted into the apoplast [9,10]. More than 20 TLPs from animals, fungi and plants have been shown to exhibit an antifungal activity [7], although the mechanisms by which TLPs exert this activity remain unclear. Several antifungal modes of action have been described

* Correspondence: duplessis@nancy.inra.fr

¹INRA†/Nancy Université, Unité Mixte de Recherche 1136 'Interactions Arbres/Micro-organismes', Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France

Full list of author information is available at the end of the article

such as membrane permeabilization [11], β -glucan binding and degradation [5], inhibition of enzymes such as xylanases [12], α -amylase, or trypsin [13], as well as an apoptosis-inducing mechanism reported in yeast [14]. Other functional properties have been reported for TLPs, including antifreeze activity [15], protection from abiotic stress [16] and binding to proteins such as actin, viral CMV-1 protein, yeast glycoproteins and G-Protein Coupled Receptor (GPCR) or to hormones such as cytokinins [7].

Most typical TLPs described to date have a molecular weight ranging from 20 to 26 kDa, and generally possess 16 conserved cysteine residues that form eight disulfide bonds [17]. Recently, small TLPs (sTLPs) have been identified in monocots and conifers. These are characterized by a smaller molecular weight (around 17 kDa) and only 10 conserved cysteine residues that form five disulfide bonds [18-20]. Seven TLP structures have been solved so far, revealing a strongly conserved 3D organisation with a characteristic acidic cleft domain that comprises the five highly conserved amino acids REDDD that are dispersed in the primary sequence [21]. Despite good conservation of these amino acids in sTLP primary sequences, they do not organize into an acidic cleft at the 3D level [22]. Unusual TLP and protein kinase fusion proteins referred to as PR5-kinase or TLP-kinase (TLP-K) have also been reported in a few plant species [23,7].

The analysis of the *Populus trichocarpa* 'Nisqually-1' genome revealed a substantial over-representation of genes encoding disease resistance proteins compared with annual species such as *Arabidopsis thaliana*, and this increase is not solely attributable to the genome expansion in *Populus* [24]. In particular, 55 putative TLP genes were initially identified in *P. trichocarpa* versus 24 for *A. thaliana* [24]. *Populus* spp. are economically important and hybrid poplars in particular are used extensively worldwide for wood production. Breeding programs particularly target resistance to *Melampsora* spp. fungi, which are responsible for leaf rust, a major disease of poplars that severely impacts tree growth and wood production [25]. With the availability of both *P. trichocarpa* and *M. larici-populina* genome sequences, the biotrophic poplar-rust interaction is emerging as a model pathosystem in forest biology [26]. Several transcriptome-based studies revealed transcriptional reprogramming in poplar leaves infected by *Melampsora* spp., including the up-regulation of many PR proteins [26]. In particular, transcript profiling of poplar leaves during an incompatible interaction (i.e. host-specific resistance) with *M. larici-populina* established a set of host-defense marker genes, including several TLPs [27].

The present study describes the annotation of 42 TLP gene models in the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome

version 2.0. In addition, comparison of expression studies conducted on poplar subjected to biotic (i.e. *Melampsora* spp. infection) and abiotic stresses identified stress-responsive clades. The comparison of 598 complete eukaryote TLP amino acid sequences, of which 410 come from the 18 plant genome sequences currently available, allowed us to establish a link between function and phylogeny by systematically mapping functional data mined from the literature to the phylogenetic tree. *In silico* structural analysis confirmed that, with the exception of sTLPs, the acidic cleft domain is strongly conserved among eukaryote TLPs.

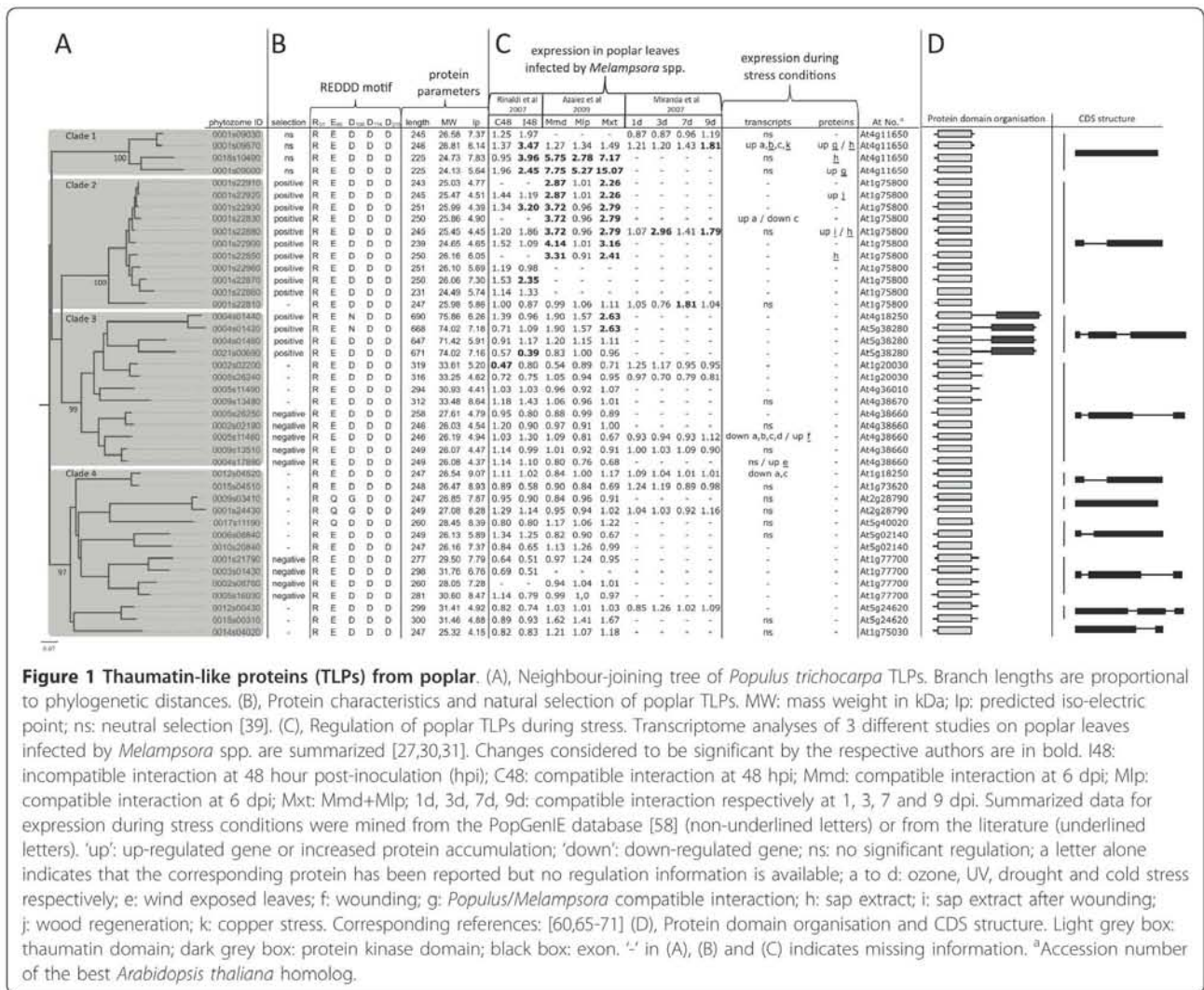
Results

Annotation, phylogeny, genomic distribution and gene expression of poplar TLPs

In contrast to Tuskan and collaborators [24], we identified a total of 59 putative TLP genes in the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome version 1.1. In version 2.0 of the genome, now integrated in the Phytozome portal [28,29], 17 of these TLP gene models are not validated. These 17 invalidated models include 11 predicted alleles that were previously considered to be independent genes and six probable pseudogenes that are interrupted by stop codons (Additional file 1). The remaining 42 TLP genes that are validated in version 2.0 of the genome comprise 38 typical TLPs and four genes with strong homology to TLP-K from *A. thaliana*, including fusion to a putative protein kinase (Pfam: PF00069) ([23], Additional file 2).

A phylogenetic tree constructed with the validated poplar TLPs reveals four well-defined clades, numbered here from 1 to 4. Among these clades, the REDDD residues are highly conserved with only small variations for five TLPs (Figure 1). The size of the proteins varies from 225 to 319 amino acids (~24 to 34 kDa) for the 38 typical TLPs and is approximately 650 amino acids (~73 kDa) for the four TLP-Ks. The predicted isoelectric points vary from 4.15 to 9.07 and correspond well with the TLP phylogeny (Figure 1). Analysis of the protein domain organisation showed that the thaumatin domain (Pfam: PF00314) covers almost 95% of the entire mature TLPs, except 10 TLPs in clades 3 and 4 that have approximately 40 additional amino acids in their C-terminal region. The four TLP-Ks are grouped in a specific branch of clade 3, suggesting that they are monophyletic in poplar. The gene structure of poplar TLPs is well conserved within clades 1-3, with genes belonging to clade 1 formed by a single exon, TLPs from clade 2 by two exons and TLPs of clade 3 by three exons (Figure 1); clade 4 is an exception with genes composed of one, two or three exons.

The version 2.0 of the *P. trichocarpa* genome incorporates a greatly improved physical map compared with



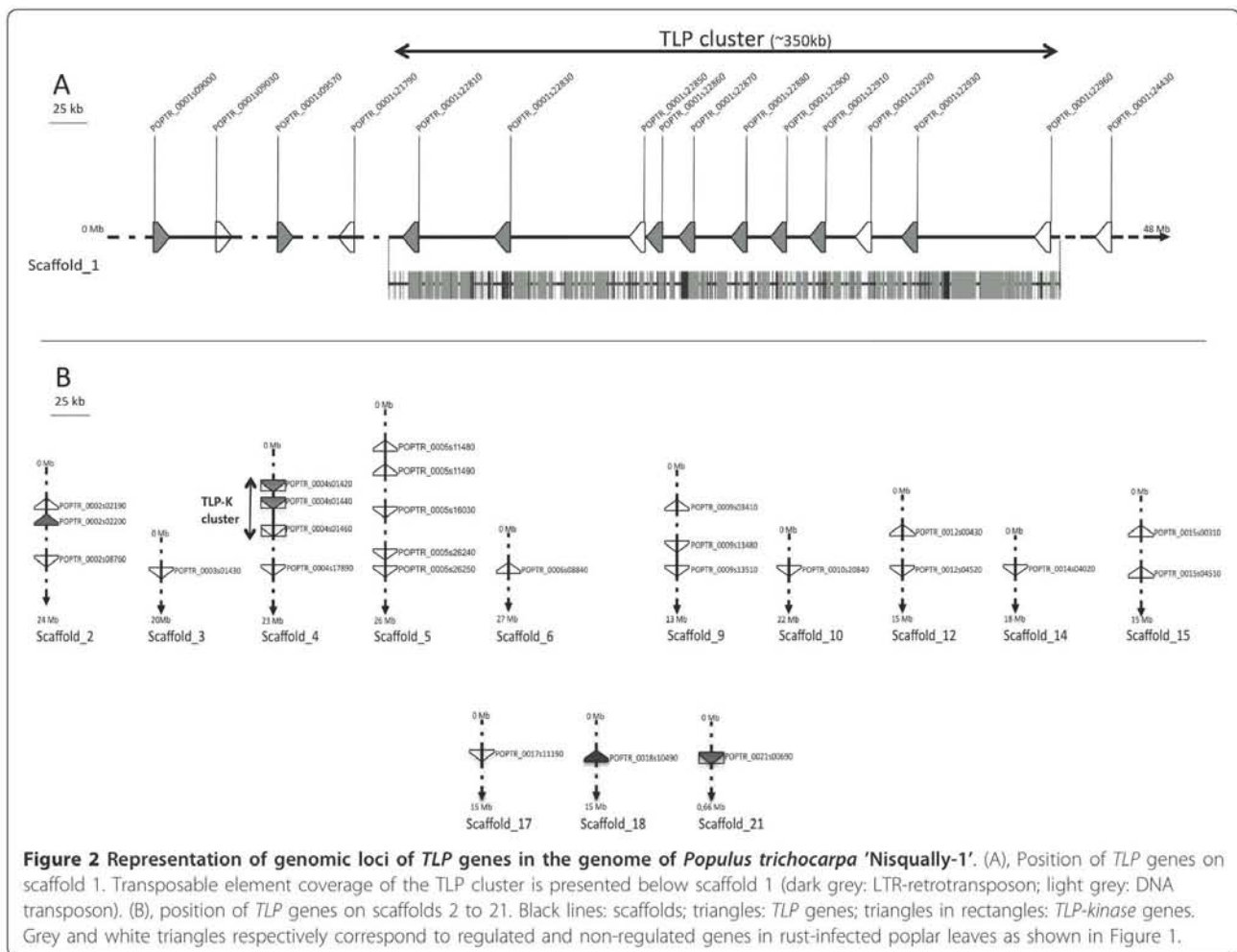
version 1.1. This helped localise 41 of the 42 annotated *TLP* genes on 13 of the 19 chromosomes (i.e. scaffolds 1 to 19 on the Phytozome portal [29]) (Figure 2). Scaffold 1 contains 16 *TLP* genes, including all 11 *TLP* genes from clade 2 which are located within a 350 kb segment that encodes *TLPs* exclusively. We named this region the *TLP* cluster. Transposable elements (TE) cover 52% of this 350 kb region, with a particular over-representation of long terminal repeat (LTR) Gypsy elements that cover 37% of the cluster (Figure 2 and Additional file 3).

Results compiled from three different previously published transcriptome analyses of poplar leaves infected by *Melampsora* spp. fungi [27,30,31] indicate that, of the 42 *TLP* genes, 14 are significantly up-regulated and two are significantly down-regulated (Figure 1). Among the 14 up-regulated *TLP* transcripts, 12 belong to clades 1 and 2 and 11 of these are located on scaffold 1 (Figure 1 and 2). Interestingly, five *TLP* genes are up-regulated during an incompatible poplar/rust interaction, of which

three are grouped in clade 1. Under abiotic stress conditions, five poplar *TLP* transcripts showed differential accumulation. In addition, six *TLPs* were identified by different proteomic studies, of which four were shown to accumulate during biotic or abiotic stress (Figure 1). More specifically, the *PopTLP1* gene (*P. trichocarpa* geneID Poptr_0001s09570) from clade 1 is associated with several biotic and abiotic stresses and we confirmed with a detailed time-course analysis by RT-qPCR that *PopTLP1* expression increases in poplar leaves challenged by *M. larici-populina* (Additional file 4).

TLPs in green plant genome sequences

We performed an exhaustive genomic analysis of plant *TLPs* by collecting *TLP* gene models from 18 sequenced plants available at the Phytozome portal [29]. Models encoding proteins with an incomplete thaumatin domain were ignored (Table 1). A single but incomplete *TLP* gene was identified in the unicellular green algae



Chlamydomonas reinhardtii, which represents the evolutionary starting point of viridiplantae, and thus makes the origin of complete TLPs in the green lineage unclear (Table 1). Three complete TLP genes were identified in the moss *Physcomitrella patens* and 12 were found in the vascular plant *Selaginella moellendorffii*, indicating that an important gene expansion occurred in the transition from bryophytes to tracheophytes. Among the 15 angiosperm genomes, the TLP gene number varies from 16 in the barrel clover *Medicago truncatula* to 42 in the black cottonwood *P. trichocarpa*, whereas *A. thaliana* has 22 TLP genes. An average of 26 TLP genes are present in angiosperms, with similar numbers of TLPs in dicots or monocots (Table 1). sTLP-encoding genes were identified exclusively in monocots (from 2 in *Zea mays* to 9 in *Sorghum bicolor*), whereas TLP-Ks have been identified in both monocots and dicots, although dicot TLP-Ks were restricted to the *A. thaliana* and *P. trichocarpa* genomes. To identify the genes that are most similar to TLP-Ks in the remaining dicots, we performed homology searches with the kinase domain of

TLP-Ks and retrieved only lectin-kinase genes, confirming the absence of TLP-Ks in these dicot genomes (data not shown). In *S. bicolor*, a small-TLP-kinase (here termed sTLP-K) composed of a N-terminal sTLP domain and a C-terminal protein kinase domain, separated by a predicted transmembrane (TM) domain, was identified (Additional file 5). The origin of this arrangement is puzzling and has apparently evolved independently of TLP-Ks. To our knowledge, this is the first report of such a domain organisation.

Eukaryote TLPs: linking phylogeny with protein structure and function

To achieve an accurate and complete phylogeny of eukaryote TLPs, we retrieved an additional 188 sequences with a complete thaumatin domain from the NCBI protein database [32] and combined them with the 410 plant sequences that we identified earlier (Additional file 6). These include several sequences from fungi (basidiomycetes and ascomycetes) and invertebrate animals (nematods and arthropods), as well as other

Table 1 TLP gene content in sequenced plant species

organism	code	common organism name	phylum	class	order	TLP blast result ^a	complete TLP domain ^c	small-TLP/TLP-K ^d
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlre	Green algae	Chlorophyte	Chlorophyceae	Volvocales	1	0	0/0
<i>Physcomitrella patens</i>	Phypa	Moss	Bryophyte	Bryopsides	Funariales	5	3	0/0
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selmo	Lycophyte	Tracheophyte	Sellaginellopsides	Selaginellales	18	12	0/0
<i>Oryza sativa</i>	Orysa	Rice	Angiosperm	Monocotyledon	Cyperales	37	26	4/1
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi	Purple false brome	Angiosperm	Monocotyledon	Poales	32	24	3/2
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorbi	Sorghum	Angiosperm	Monocotyledon	Poales	45	36	9/1(1 ^e)
<i>Zea mays</i>	Zeama	Maize	Angiosperm	Monocotyledon	Poales	38	29	2/2
<i>Mimulus guttatus</i>	Mimgu	Common monkey-flower	Angiosperm	Dicotyledon	Lamiales	33	23	0/0
<i>Vitis vinifera</i>	Vitvi	Grapevine	Angiosperm	Dicotyledon	Rosales	27	18	0/0
<i>Carica papaya</i>	Carpa	Papaya tree	Angiosperm	Dicotyledon	Brassicales	18	16	0/0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arath	Thale cress	Angiosperm	Dicotyledon	Brassicales	30	22	0/3
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa	Cucumber	Angiosperm	Dicotyledon	Cucurbitales	29	28	0/0
<i>Glycine max</i>	Glyma	Soya	Angiosperm	Dicotyledon	Fabales	58	38	0/0
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr	Barrel clover	Angiosperm	Dicotyledon	Fabales	21	16	0/0
<i>Prunus persica</i>	Prupe	Peach tree	Angiosperm	Dicotyledon	Rosales	37	28	0/0
<i>Manihot esculenta</i>	Manes	Manioc	Angiosperm	Dicotyledon	Malpighiales	34	27	0/0
<i>Ricin communis</i>	Ricco	Castor oil plant	Angiosperm	Dicotyledon	Malpighiales	24	22	0/0
<i>Populus trichocarpa</i>	Poptr	Poplar	Angiosperm	Dicotyledon	Malpighiales	59 ^b	42	0/4

^aNumber of putative TLP genes identified by amino acid homology searches of plant genome sequences on the Phytozome portal [29].

^bNumber of putative TLP genes identified from version 1.1 of the *Populus trichocarpa* 'Nisqually-1' genome on the JGI website [55].

^cTLP sequences with a complete thaumatin domain.

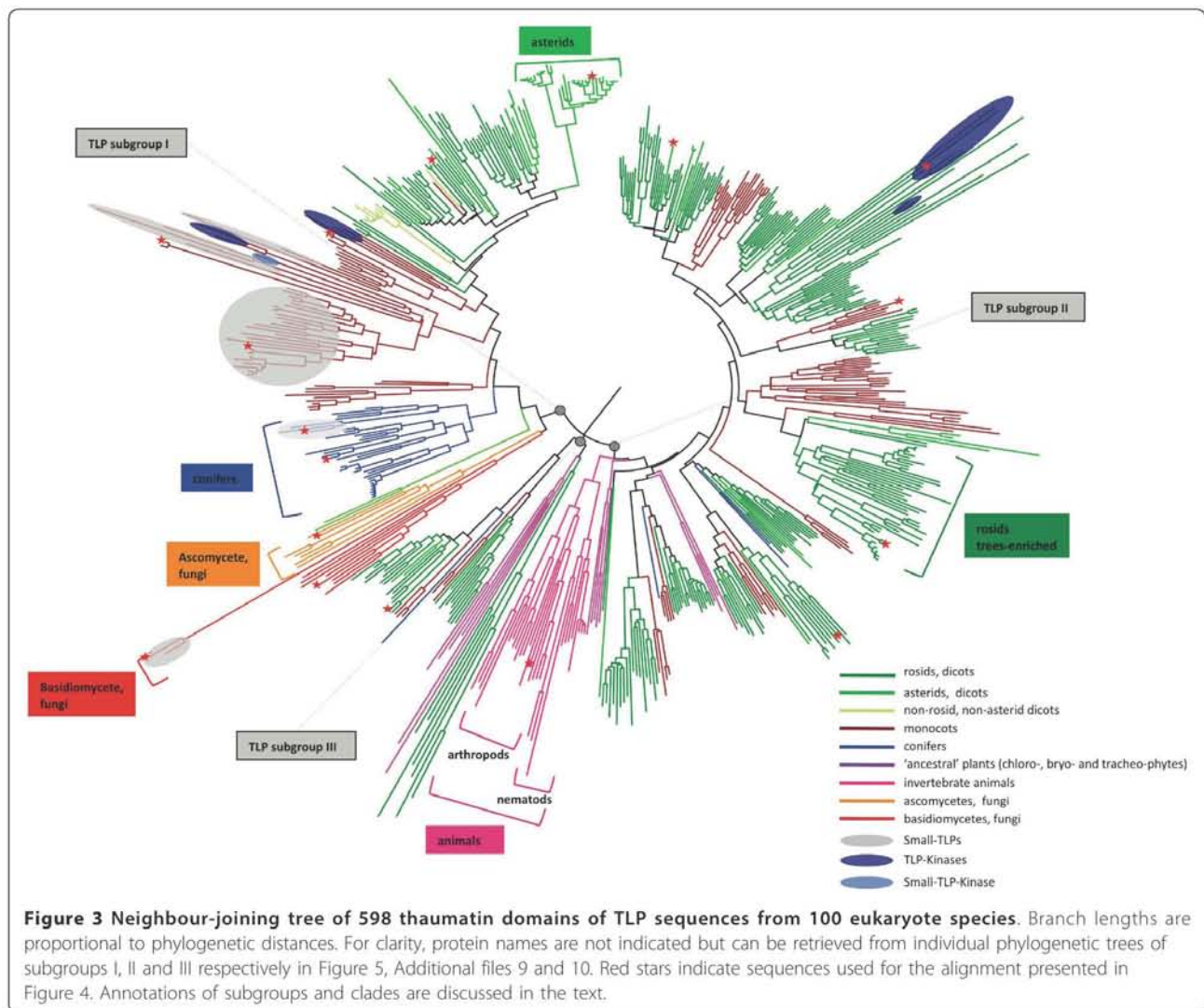
^dProportion of sTLP and TLP-K with a complete thaumatin domain.

^esmall-TLP/kinase domain fusion (sTLP-K).

plants from mainly the asterid and conifer divisions. We report for the first time the identification of sTLP genes in basidiomycetes, precisely in the pucciniales *M. laricipopulina* and *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. Fungal sTLPs appear to be monophyletic, suggesting that sTLPs evolved independently in pucciniales, monocots and conifers or that sTLPs were lost during evolution from other phyla such as dicots and animals (Additional file 7). Overall, a total of 598 sequences were retrieved from 100 different species (12 animals, 12 fungi and 76 green plants) and were used for comparative genomic analyses. The phylogeny of these eukaryote TLPs reveals three major monophyletic groups (Figure 3). TLP subgroup I consists of 211 sequences and includes highly specific clades, such as a fungal clade containing TLPs from both ascomycetes and basidiomycetes, as well as plant clades that are specific to conifers, monocots, monocot sTLPs, monocot TLP-Ks, dicots or asterids. TLP subgroup II is composed of 341 sequences and includes an animal-specific clade with distinct sub-clades for nematodes and arthropods. Because of their over-representation, a large clade of plant sequences constitutes the vast majority of TLP subgroup II, with several subclades

composed of relatively balanced numbers of monocot and dicot sequences (Figure 3). TLP subgroup II notably includes a clade enriched in rosid and tree TLPs that in particular contains the poplar TLP cluster. Dicot TLP-Ks also belong to TLP subgroup II. TLP subgroup III contains only 46 sequences from 20 different plant species, with a large number of sequences from the vascular plant *S. moellendorffii* (Figure 3).

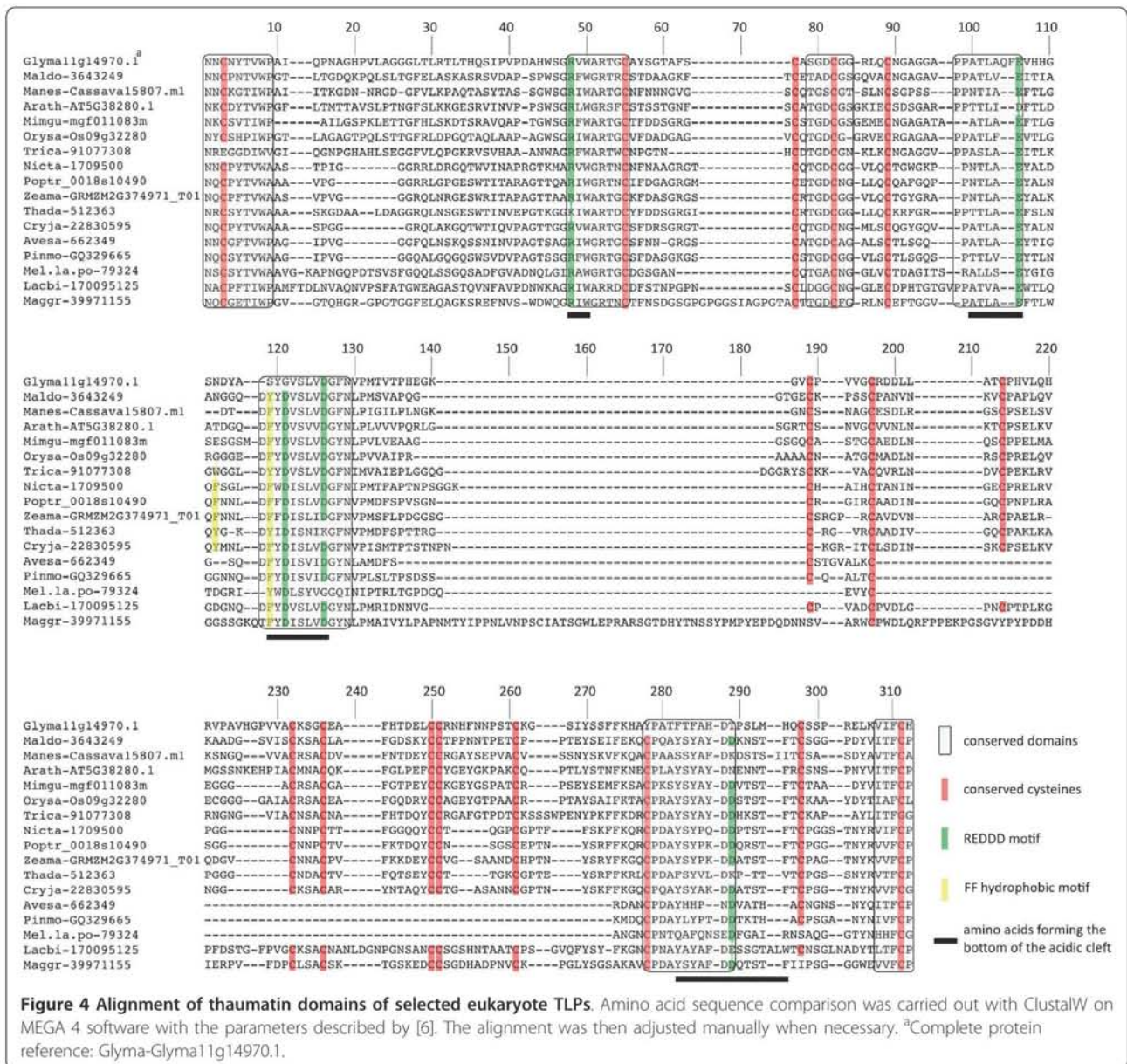
An alignment with 18 representative TLP sequences from the major sub-clades shows the diversity of eukaryote TLPs (Figure 4). The thaumatin domain of ascomycetes is almost 30% longer than that of typical TLPs (~280 versus ~215 amino acids), mainly due to three insertions in less-conserved regions of the domain. By contrast, sTLPs are almost 30% smaller than typical TLPs (~150 versus ~215 amino acids) due to a large deletion. The 16 cysteine residues (10 for sTLPs) are extremely well conserved, except for 1-2 residues in ascomycete and basidiomycete sTLPs and in some animal sequences (Figure 4). The REDDD motif or its equivalent (i.e. amino acids with similar biochemical properties) is fully conserved in 13 of the 18 representative sequences. Similarly, the amino acids forming the



bottom of the acidic cleft and those at each extremity of the thaumatin domain are generally well conserved.

Information about the biological and/or biochemical properties were compiled for 26 TLPs with a complete amino acid sequence from an exhaustive survey of the literature (Additional file 8). These data were added systematically to the phylogenetic sub-trees of TLP subgroups I (Figure 5) and II (Additional file 9). Among these 26 TLPs, 21 have antifungal activity and nine have endo- β -1,3-glucanase activity. Surprisingly, antifungal TLPs are widespread among eukaryotes, as 13 are present in TLP subgroup I and 8 are in TLP subgroup II. A similar widespread assortment across TLP subgroups I and II was obtained for TLPs that exhibit endo- β -1,3-glucanase or antifreeze activities. Compared with the large amount of information available concerning asterid TLPs (many functions have been described for two TLPs of subgroup I: tobacco osmotin, Nicta-1709500, and maize

zeamatin, Zeama-grmzm2g394771), there is almost no functional characterization of conifer and fungal TLPs or sTLPs. One exception is TLX1, a sTLP from wheat (Triae-110836639), which is the only sTLP characterized to date and the only TLP shown to have xylanase inhibitor activity (Additional files 7 and 8). Among poplar TLPs, only the four TLPs from the poplar clade 1 (Figure 1) belong to the eukaryote TLP subgroup I (Figure 5). Proteins from TLP subgroup II have been poorly characterized, except for the rosid-specific and tree-enriched clade, which contains several proteins with described antifungal or endo- β -1,3-glucanase activities (Additional file 9). Thirty-one poplar TLPs are distributed in TLP subgroup II, including the 11 TLPs that form the poplar TLP cluster and which are assembled in the tree-enriched clade. To our knowledge, none of the proteins from subgroup III have been characterized at the functional level so far (Additional file 10).



To estimate how TLP structural diversity influences biological and biochemical functions, a 3D structure alignment (3D-SA) was performed with the phylogenetically most distinct TLP structures available among the seven solved to date: the tobacco PR-5d (Nicta-1709500; PDB: 1AUN) from TLP subgroup I and the cherry Pru Av 2 (Pruav-1729981; PDB: 2AHN) from TLP subgroup II (Figure 6). In general, the 3D structures of these TLPs superimpose well, especially the region forming the acidic cleft. Indeed, this region, as well as two hydrophobic or aromatic residues (generally Phe or Tyr), are important for the antifungal or lytic activities of TLPs (Figure 6, [21]). However, although well conserved, some residues of the REDDD and FF motifs adopt

slightly different positions in these two TLPs. For example in the Pru Av 2 structure, the side chain of the aspartate at position 289 (D₂₈₉) is oriented outside the acidic cleft and the phenylalanine residue F₁₁₉ is replaced by a small non-aromatic residue (Gly) that is positioned differently. It is not clear whether these small differences have a significant impact on the substrate selectivity or protein function. Primary sequence alignment mapping on 3D structures (AM-3D) of PR-5d and Pru Av 2 with sequences from subgroups I and II, respectively, confirmed that the acidic cleft is the most conserved region among eukaryote TLPs (Figure 6). By contrast, although the REDDD amino acids are conserved in most sTLPs, AM-3D of several sTLP

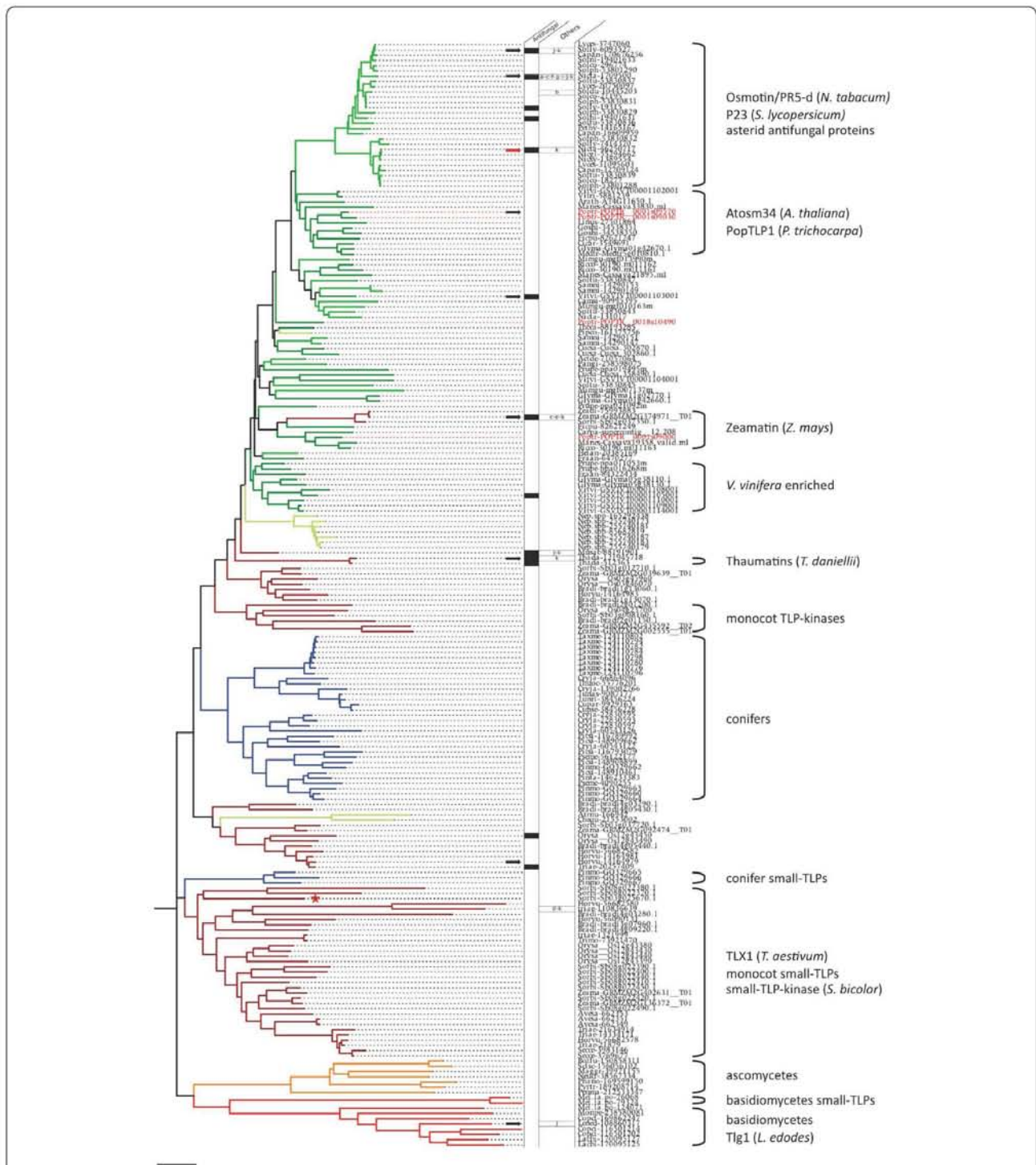


Figure 5 Neighbour-joining tree of the 211 thaumatin domains of TLP subgroup I. Functionally characterized TLPs and corresponding functions are indicated. Poplar sequence names are in red. The 5 letter code before each protein ID corresponds to the 3 first letters of the genus name followed by the 2 first letters of the species name. The red arrow indicates PR-5d used for 3D structure alignment and black arrows indicate sequences used for alignment mapping on 3D Structure (see Figure 6). The red star indicates the Small-TLP-Kinase from *Sorghum bicolor* (Sb03g025670). The two columns successively indicate proteins with demonstrated antifungal activity and other functions. a: protection against abiotic stress; b: antifreeze activity; c: membrane permeabilization activity; d: xylanase inhibitor; e: α -amylase/trypsin inhibition; f: apoptosis-inducing in yeast; g: GPCR binding; h: CMV1-a binding; i: glycoprotein binding; j: endo- β -1,3-glucanase activity; k: solved 3D structures. References corresponding to these data are summarized in Additional file 8. Branch lengths are proportional to phylogenetic distances.

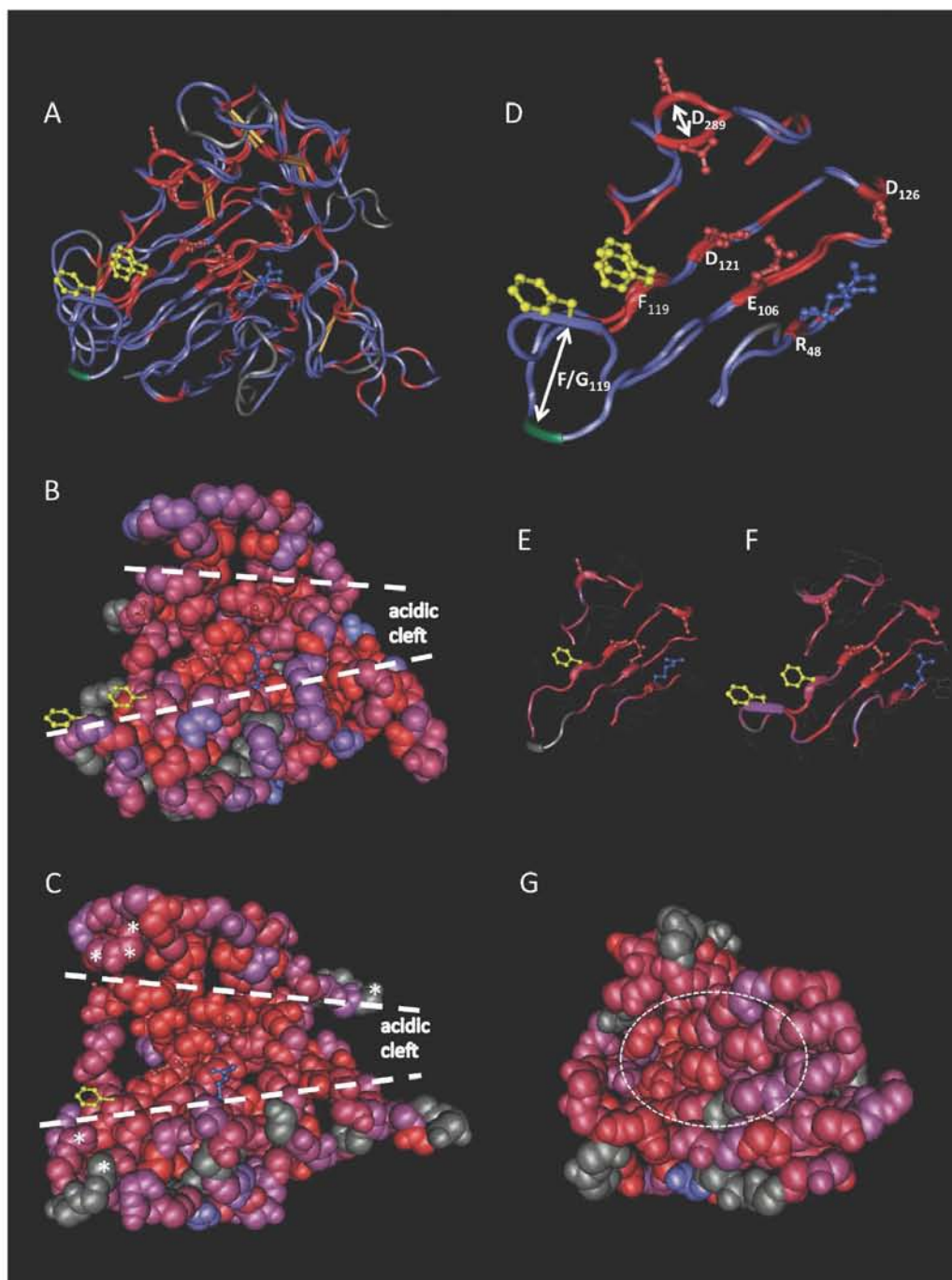


Figure 6 3D structure alignment (3D-SA) and alignment mapping on 3D structure (AM-3D) of eukaryote TLPs. Amino acids of the REDDD and FF motifs are represented with side-chains in balls and sticks. Color code of side-chains, red: negatively charged; blue: positively charged; yellow: hydrophobic. White dashed-lines indicate acidic cleft limits. (A), 3D-SA of tobacco PR-5d and cherry Pru av 2. Protein backbone color code, red: identical amino acids; blue: different amino acids; grey: unaligned residues, green: glycine/phenylalanine residues discussed in the text. Disulfide bonds are in orange. (B), AM-3D of 9 subgroup I TLPs using the PR-5d structure as template. The four-color code of the protein backbone (from red to blue) corresponds to a decrease in amino acid conservation. (C), AM-3D of 15 subgroup II TLPs using the Pru Av 2 structure as template. Color code and annotations are as in B. Amino acids under diversifying selection [39] are indicated by white asterisks. (D, E and F), Highlights of β -sheets forming the acidic cleft in A, B and C respectively. Color code is similar to that in A, B and C. In D, the residues forming the REDDD and FF motifs are numbered as in Figure 4. White arrows indicate motif differences discussed in the text. (G), AM-3D of the 9 small-TLPs indicated in Additional file 7 using the TLX1 structure as template. Color code is similar to that in B. A white dashed ellipse marks the missing acidic cleft.

sequences with the recently solved structure of wheat TLX1 (PDB: 1KWN) revealed neither an acidic cleft nor any particular conserved region which could be linked to the reported xylanase inhibitor function (Figure 6, [12]).

Alignment of the 14 TLP-Ks identified from six different plant species (two dicots and four monocots), including the four poplar TLP-Ks, revealed that the thaumatin domain of TLP-Ks is similar to that of typical TLPs, possessing both the conserved residues involved in the acidic cleft and the cysteine residues (Figure 7). The protein kinase domain of TLP-Ks is extremely well conserved, even among monocots and dicots, and contains two fully conserved residues D₇₄₀ and D₇₅₈ known to be part of the catalytic motif [33]. A predicted TM domain is present between the thaumatin and the

protein kinase domains in all TLP-K sequences (Figure 7, Additional file 5), except Bradi-2g01200, which might be due to an erroneous interdomain annotation in the *Brachypodium distachyon* genome.

Discussion

The recent release of the *P. trichocarpa* genome, the first tree genome available, paved the way for high-throughput genomic and computational analyses of multigene families, and has defined *Populus* as a model organism in forest biology [34]. Considering that leaf rust fungi are responsible for considerable damage in poplar plantations, the *Populus/Melampsora* interaction has emerged as a model pathosystem in forest pathology [26]. In order to decipher the molecular basis of poplar resistance against this biotrophic fungus, in-

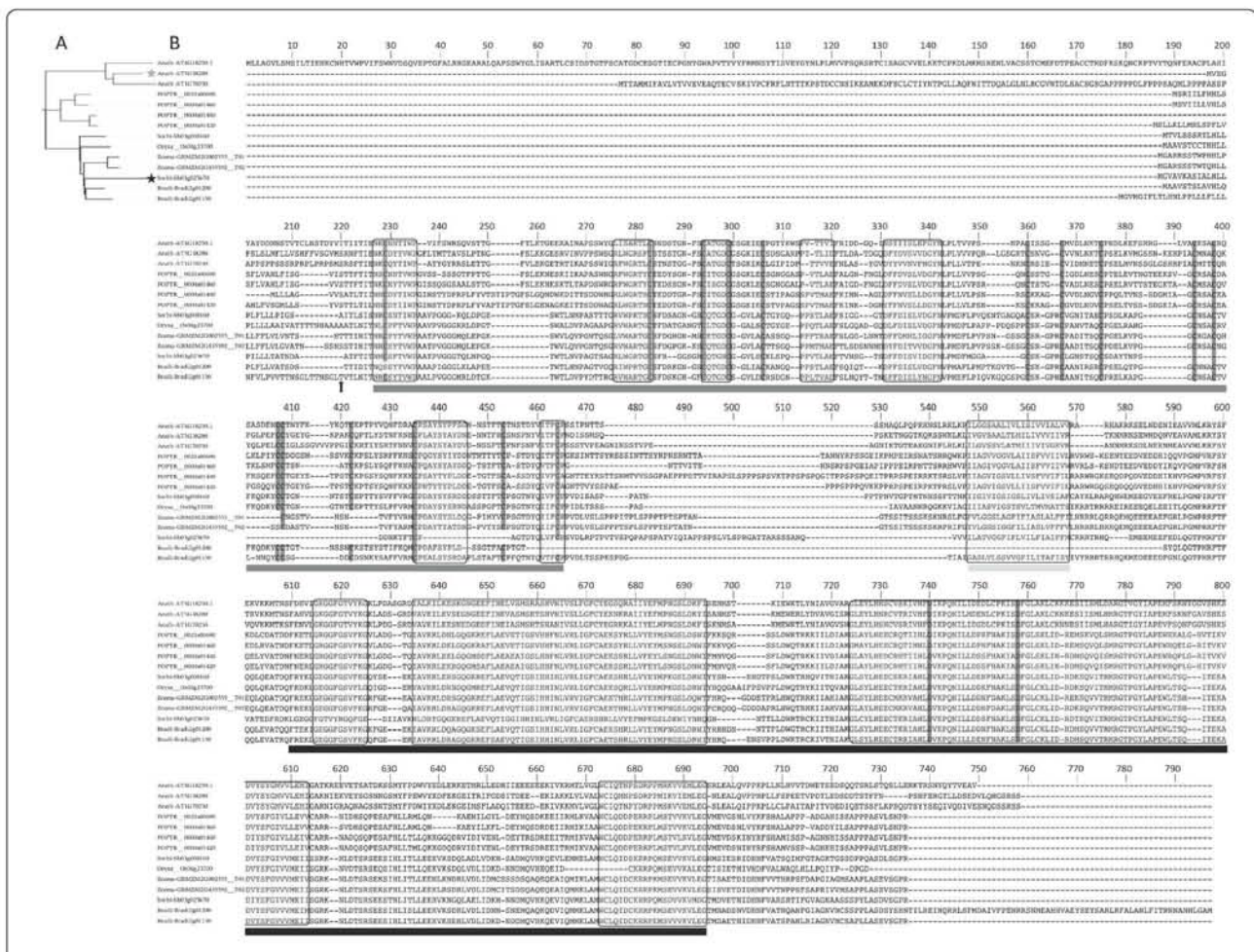


Figure 7 Amino acid sequence comparison of plant TLP-kinases (TLP-Ks). (A), Neighbour-joining tree of the 14 TLP-Ks identified in plants. Branch lengths are proportional to phylogenetic distances. Black star: sTLP-K from *Brachypodium distachyon*; grey star: TLP-K from *Arabidopsis thaliana* described in [51]. (B), ClustalW amino acid alignment using the parameters described by [6] and manually adjusted. Thaumatin and protein kinase domains are respectively underlined in dark grey and black. Phobius [72] predicted transmembrane domain is underlined in light grey. Shaded boxes indicate highly conserved sequences. The arrow indicates the end of the predicted signal peptide. Vertical bars indicate cysteine residues in the thaumatin domain and aspartate residues forming the catalytic site of the kinase domain.

depth and exhaustive studies of defense-related functions require a reliable annotation of gene families before we can understand their structural and functional diversity. We have therefore performed a genome-wide analysis of the TLP multigene family, which comprises many stress-inducible proteins in *P. trichocarpa*. Extension of the phylogenetic analysis to include TLPs from other eukaryotes extends our knowledge about the evolution of TLPs.

TLPs in plant genomes: an evolutionary diversification

The history of TLP multigene families retraced from 18 plant genome sequences shows a strong evolutionary diversification from the green alga *C. reinhardtii* to the black cottonwood tree *P. trichocarpa* (Table 1). In the co-evolution of host-microbe interactions, plants and fungi acquire new weapons that promote their resistance or virulence, respectively [35]. As a consequence of this arms race, the size of some multigene families involved in resistance (such as NB-LRRs) has greatly increased in poplar and other higher plants [36]. It is accepted that this increase, sometimes specific to certain organisms, represents an important means for generating functional diversity via sub- or neo-functionalization of paralogs [37]. Analysis of natural selection is increasingly used in plant pathology to estimate how evolutionary forces impact genes and corresponding proteins, from the scale of amino acid sites to gene families [38]. Poplar TLP genes have recently been investigated for natural selection. The four TLP-Ks and 10 of the 11 TLPs that belong to clade 2 (i.e. the poplar TLP cluster) were shown to be driven by diversifying (positive) selection (Figure 1, [39]). More precisely, several exposed amino acids of TLPs are under diversifying selection, whereas amino acids forming the acidic cleft are under purifying (negative) selection and thus well-conserved (Figure 6). Conservation of the acidic cleft could be necessary to maintain antifungal activity, whereas diversification of exposed amino acids could avoid recognition by pathogen enzyme-inhibitors or proteases [40].

Is the antifungal activity of TLPs a universal property?

Historically, TLPs have been described as biotic and abiotic stress-responsive proteins and were called TLPs/PR5 or osmotin/osmotin-like proteins (OLPs), depending on the stress condition (i.e. biotic or abiotic stress, respectively) in which these proteins or their closest homologs were first described. As already suggested by Shatters and collaborators [6], phylogenetic analyses do not support this separate nomenclature that generates semantic confusion in the literature [41]. Our broad sequence analysis of eukaryote TLPs confirms that there is no clear difference among TLPs and OLPs, since different TLP functions are not separated by distinct

phylogenetic clades. In fact, the major biochemical properties of TLPs such as antifungal or endo- β -1,3-glucanase activity are widespread among eukaryotes (Figure 5 and Additional file 9). At the structural level, most TLPs are predicted to share a conserved acidic cleft, which is usually associated with an antifungal property, suggesting that this property is universal among eukaryote TLPs (Figure 6). Although more subtle conformational differences might explain the large variety of properties described so far for TLPs, the phylogenetic and functional data do not justify adoption of a distinct nomenclature between biotic- and abiotic-responsive TLPs. An exception to this statement might be considered for TLPs with different domain organisations such as sTLPs or TLP-Ks. Indeed, sTLPs are assumed to act as xylanase inhibitors and no antifungal activity has yet been reported [12]. This functional divergence is consistent with the important structural differences observed and in particular with the absence of a well-defined acidic cleft (Figure 6).

Poplar TLPs: stress-responsive proteins, but not only

The release of the *P. trichocarpa* genome version 2.0 and its integration into the Phytozome portal enabled a drastic improvement of TLP gene annotation and the validation of more than 70% of the 59 TLP gene models from the *Populus* genome version 1.1 [Additional file 1, [24]]. The expression analysis of TLPs during biotic and abiotic stresses supports the idea that TLPs, like other PR proteins, belong to a general plant stress response pathway rather than being specific to distinct stresses, as often hypothesized [1]. This is exemplified by *PopTLP1*, whose expression is induced by diverse environmental constraints such as high ozone, UV-B, drought, copper and infection by rust fungi (Figure 1 and Additional file 4). In addition, *PopTLP1* is the closest homolog of *A. thaliana Atosm34* (At4g11650), which also accumulates during both biotic and abiotic stress conditions [8,42]. The RT-qPCR expression profile of *PopTLP1* in rust-infected poplar leaves confirmed transient transcript accumulation during host-specific resistance (Additional file 4). This profile is in accordance with results obtained by similar approaches for several PR proteins in this pathosystem [27] and confirms the involvement of TLPs in poplar defense.

However, the fact that only 19 of the 42 poplar TLPs are transcriptionally regulated in the stress conditions investigated suggests that their role in poplar might not be restricted to stress response but that they could have other roles, such as during development. Indeed, some TLPs have been reported to accumulate during plant developmental stages or conditions such as in ovular secretions or during leaf aging [43,44]. In addition, TLPs have been extensively described as ripening-associated

proteins that accumulate strongly in fruit during maturation [45,46]. It has been shown recently in hybrid poplars that two TLPs belonging to the tree-specific and stress-responsive TLP cluster (Figure 1 and 2) are present in the phloem of healthy non-stressed plants [47]. Taken together, these results suggest that the expansion of this multigene family in poplar could also be related to tree-specific developmental stages.

The poplar TLP cluster contains tree-specific and stress-responsive proteins

The poplar TLP cluster is an assembly of 11 successive genes on scaffold 1 and is considerably enriched in TE for a gene-containing genomic region. Indeed, TE account for 52% of the TLP cluster region compared with an average coverage of 42% in the whole genome [24]. Moreover, LTR TE from the Gypsy class are specifically over-represented, covering 37% of the TLP cluster compared with 5% in the whole *P. trichocarpa* genome sequence (Figure 2, [24]). This class of TE might be a source of genome plasticity in plants [48]. The very well-conserved exon-intron structure of the genes in the TLP cluster supports a mechanism of tandem duplication from a unique ancestral gene (Figure 1). Taken together, these results strongly suggest that this cluster likely resulted from recent tandem duplications driven by TE activity. Furthermore, the TLP cluster appears to be highly responsive to fungal infection in poplar and belongs to a rosid-specific and tree-enriched clade in our complete phylogeny of eukaryote TLPs (Figure 1, Figure 3 and Additional file 9). TLPs from cherry, chestnut, apple and peach trees that exhibit antifungal and/or endo- β -1,3-glucanase activities (Additional file 8 [49,50]) also belong to this clade. Thus, the TLP cluster appears to be a tree-specific and rust-responsive group of TLPs that are of outstanding interest for further analyses focusing on tree and TLP specificities in defense against pathogens. More precisely, two TLPs recently identified at the protein level in the phloem of hybrid poplar constitute excellent candidates for future investigations ([47], Figure 1).

TLP-Ks: defense proteins recruited for signaling?

TLP-Ks result from the fusion between two genes coding for a TLP and a protein kinase. They have been hypothesized to act as receptor-like kinases (RLKs), where the extracellular TLP could sense pathogens and the cytoplasmic kinase could relay downstream signaling [23]. This assumption was strengthened by the demonstration that plants overexpressing an *A. thaliana* TLP-K showed a delay in the appearance of disease symptoms [51]. The ability of plants to recruit defense proteins to form a RLK involved in pathogen sensing has already been suggested for PR1 and PR3 [1]. The

strong homology of the kinase domain between TLP-K and some lectin-kinases reinforces the speculation about the potential role of TLP-K in the induction of the defense system, since a rice lectin-kinase has been shown to confer resistance to the rice blast [52]. In the *P. trichocarpa* genome, three TLP-Ks are organized in tandem on scaffold 4 and are interspersed by other protein kinase-encoding genes. This genomic region is referred to as the 'TLP-K cluster' (Figure 2). Genetic and physical mapping of *Melampsora* rust resistance genes in natural populations of *P. trichocarpa* identified a locus encoding two *TLP-K* genes on chromosome 4, which possibly corresponds to the TLP-K cluster in scaffold 4 of the *P. trichocarpa* genome sequence [53]. Hence, although evidence is still needed to clarify the exact role of these TLP-Ks in poplar, this opens interesting perspectives concerning new RLK types related to poplar defense against *Melampsora* spp. rust pathogens.

Conclusion

TLPs are eukaryote proteins that constitute small and monophyletic families in invertebrate animals and fungi whereas they are more diverse and are organized in large multigene families in plants. Regardless of their origin, it appears that many typical TLPs possess an antifungal activity, which is probably linked to a conserved acidic cleft in their 3D structure. In plants, TLPs have undergone a drastic evolutionary diversification including the evolution of tree-enriched clades and of TLPs fused to protein kinase domains. The poplar genome encodes 42 validated *TLP* gene models, including four TLP-kinases. Some poplar TLP transcripts accumulate specifically under abiotic or biotic stress conditions, which can be strongly correlated with their phylogeny. In the poplar genome, a tree-specific and stress-responsive cluster of tandemly-duplicated *TLP* genes should be of interest for understanding the unique attributes of defense against pathogen attacks that have evolved in trees.

Methods

Identification and annotation of TLP genes in *P. trichocarpa*

TLP genes were identified in the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome using thaumatin and osmotin keywords and amino acid sequence homology searches. Manual gene annotation was performed by finding missing start/stop codons, by defining correct exon/intron borders, by analyzing perfectly matching ESTs and by taking into account the amino acid conservation of the thaumatin domain (Pfam: PF00314) and in particular the position of conserved cysteines. Alignments with closest homologs in the Phytozome portal were used to reconstruct gene structure and corresponding amino acid sequences.

Allelic versions detected by the Phytozome annotation (two adjacent genes in the genome assembly v1.1 that correspond to a single locus in the v2.0 assembly) or incomplete genes were discarded and not considered for further analysis. Transposable element analysis was carried out with the CENSOR software available on the Giri database [54].

Search for TLP in public genomic databases and sequence analyses

The 18 plant genome sequences available on the Phytozome portal [29] (June 2010) were mined using sequence homology searches. Only *TLP* gene models encoding a complete TLP domain were reserved for sequence comparison. The NCBI protein database [32] was mined using sequence homology and keyword searches (i.e. thaumatin and osmotin). TLP sequences from non-sequenced plants, fungi and animals were individually examined and amino acid sequences with a complete thaumatin family domain were retained for further analyses. Sequences from *M. larici-populina* and *P. graminis* f.sp. *tritici* were retrieved from the Joint Genome Institute (JGI, [55]) and the Broad Institute [56] websites, respectively.

Sequence alignment and construction of phylogenetic tree

For all amino acid sequence comparisons, the thaumatin domain covering almost 95% of the mature TLP protein was considered. Limits of the TLP domain were defined as N-x-C-x(3)-V/I-W and Y-x-I/V-x-F-C-x in the N- and C-terminal ends, respectively. Amino acid sequence alignments were performed using ClustalW as described by [6], DIALIGN (<http://dialign-tx.gobics.de/>) as well as MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) methods. In all cases, the raw output alignments required deep manual re-adjustment to proceed further with phylogenetic reconstruction. Raw alignments were thus imported into the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package 4.1 [57] and manually adjusted. Phylogenetic analyses were conducted using the Neighbour-Joining method with the pairwise deletion option for handling alignment gaps and the Poisson correction model for distance computation. Bootstrap tests were conducted using 1,000 replicates. Branch lengths are proportional to phylogenetic distances.

Expression of poplar TLPs

Transcriptional data for *Populus/Melampsora* interaction were extracted from published studies with significant fold-changes as described by the respective authors (Figure 1, [27,30,31]). Other information pertaining to the poplar transcriptome during stress-related situations were extracted from the PopGenIE portal [58,59] and

from the literature. Proteomic data for *Populus/Melampsora* interaction were retrieved from the PROTIcDb database [60,61] and from the literature for other stress-related situations.

3D structure analyses

3D-SA and MA-3D were carried out with Cn3D software [62]. Sequences were manually aligned using the integrated sequence viewer in editor mode and reference structures were retrieved from NCBI structure database [32]. For MA-3D, sequence conservation has been estimated with a four level color code from red to blue, reporting a respectively strong to weak amino acid variety.

RT-qPCR analyses

Isolates 98AG31 (virulent, pathotype 3-4-7) and 93ID6 (avirulent, pathotype 3-4) of *M. larici-populina* were used in this study. Rust urediniospore multiplication and plant inoculation procedures were performed as previously described [27], using the same inoculum doses (100,000 urediniospores/ml), leaf plastochron indexes for detached *P. trichocarpa* X *Populus deltoides* 'Beaupré' leaves and identical culture conditions. For time-course infection analyses, leaves were harvested at the following time-points: 0, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48, 72, 96, 120 and 168 hpi. RNA extraction, quality control and cDNA synthesis were performed as previously described in [27]. In order to assess transcript levels by RT-qPCR, specific primers for the *PopTLP1* gene (Poptr_0001s09570 in *P. trichocarpa* genome; 5' CCAGACTTGGTATCTTAATG; 3' GTTACCAAAGTATTAAACG) were designed and quantitative PCR was carried out as previously described [63], with technical and biological duplicates. Transcript expression was normalized to a reference ubiquitin transcript (Poptr_0015s01600 in *P. trichocarpa* genome; 5' GCAGG-GAAACAGTGAGGAAGG; 3' TGGACTCACGAGGACAG) using ratio calculation as described in [64].

Additional material

Additional file 1: Annotation of TLP genes in the *Populus trichocarpa* 'Nisqually-1' genome sequence. ^aTLP gene models retrieved in the *Populus trichocarpa* 'Nisqually-1' genome version 1.1 from the JGI website [55]. ^bTLP gene models retrieved in the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome version 2.0 from the Phytozome portal [29].

Additional file 2: List of amino acid sequences deduced from the 42 *P. trichocarpa* TLP gene models. Stop codons are represented by asterisks.

Additional file 3: Transposable element (TE) features of the TLP cluster. ^aPercentage of the 350 kb total length of the TLP cluster covered by TE.

Additional file 4: *PopTLP1* RTqPCR expression profile. Total RNA was isolated from mock-inoculated or inoculated leaves of *Populus trichocarpa* X *Populus deltoides* 'Beaupré' with either compatible (white diamonds, strain 98AG31) or incompatible (black diamonds, strain 93ID6) strains of *Melampsora larici-populina* between 12 and 168 hours post-

inoculation (hpi). RT-qPCR results are presented as expression ratios. *Populus* ubiquitin transcripts were as a reference gene for normalization. $n = 2$ (except for I168, $n = 1$), error bar: standard deviation.

Additional file 5: Small-TLP-kinase domains and features. The signal peptide and the transmembrane domain of the small-TLP-kinase of *Sorghum bicolor* (Sb03g025670) are predicted by the Phobius program [72].

Additional file 6: Protein accession numbers and phylogenetic classification of corresponding species used in this study. ^aOrganism code used in the study, corresponding to the 3 first letters of the genus name followed by the 2 first letters of the species name (ex: *Arabidopsis thaliana* = Arath), except for *Nepenthes species pluralis* (Nep.spp) and *Melampsora larici-populina* (Mel.la.po). ^bNumber of TLP sequences used in this study. ^cAccession numbers are preceded by the organism code. Sequences retrieved from the NCBI protein database [32] are in black, those retrieved from the Phytozome portal [29] are in red. The 3 sequences of *M. larici-populina* were retrieved from the JGI genome website [55] and are labelled with JGI protein IDs.

Additional file 7: Neighbour-joining tree of eukaryote small-TLPs. Branch lengths are proportional to phylogenetic distances. Branch color and protein ID codes correspond to those in Figures 3 and 5, respectively. Supplemental sequences from the *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* genome sequence were retrieved from the Broad Institute website [56] (gene IDs PGTG_00965.2; PGTG_00963.2; PGTG_19613.2; PGTG_19646.2). Black star: small-TLP-Kinase from *Sorghum bicolor*; grey star: TLX 1 from *Triticum aestivum*; black arrows: sequences used for the structural analysis in Figure 6.

Additional file 8: List of functionally characterized TLPs described in this study. In some cases, several studies participated to the characterization of a given TLP function. For clarity, only one reference is given per function and per protein (most relevant, otherwise first published). ^aGPCRs: G-Protein-Coupled Receptors. ^bNumbers refer to the complete reference in the text.

Additional file 9: Neighbour-joining tree of the 341 thaumatin domains of TLP Subgroup II. Functionally characterized TLPs and corresponding functions are indicated. Poplar sequence names are in red. The five-letter code before proteins IDs indicate genus and species. Red arrows indicate protein structures used for 3D structure alignment while black arrows indicate sequences used for alignment mapping on 3D structure in Figure 6. Antifungal column includes both *in vitro*- and transgenic-based antifungal demonstrations. In the other column, a: transgenic abiotic stress protection; b: antifreeze activity; c: membrane permeabilization activity; d: xylanase inhibitor; e: α -amylase/trypsin inhibition; f: apoptosis-inducing in yeast; g: GPCR binding; h: CMV1-a binding; i: glycoprotein binding; j: endo- β -1,3-glucanase activity; k: 3D structure solved. References corresponding to these data are summarized in Additional file 8. Branch lengths are proportional to phylogenetic distances.

Additional file 10: Neighbour-joining tree of uncharacterized eukaryote TLPs from TLP subgroup III. Branch lengths are proportional to phylogenetic distances. Branch color and protein IDs codes correspond to those in Figures 3 and 5, respectively. Poplar sequence names are in red.

Abbreviations

TLP: thaumatin-like protein; PR: pathogenesis-related; GPCR: G protein-coupled receptor; sTLP: small-TLP; TM: transmembrane domain; TLP-K: TLP-kinase; CDS: coding DNA sequence; sTLP-K: small-TLP-kinase; TE: transposable element; 3D-SA: 3D structure alignment; AM-3D: alignment mapping on 3D structure; OLP: osmotin-like protein; JGI: joint genome institute; RLK: receptor-like kinase; EST: expressed sequence tag; hpi: hour-post inoculation; NB-LRR: nucleotide binding-leucine rich repeat; LTR: long terminal repeat.

Acknowledgements

We warmly thank our colleagues Francis Martin, Annegret Kohler and Pascal Frey at INRA Nancy for regular and fruitful discussions about the poplar/rust

pathosystem and gene family annotation in the poplar genome. We also thank Christine Delaruelle and Patrice Vion for great technical help during RNA extraction and poplar culture respectively, Claude Murat for valuable advice on transposable elements and phylogenetic analyses, Bénédicte Favre for *M. larici-populina* spore conservation and Stéphane Hacquard for very helpful discussions on genome annotation and quantitative PCR. This work was funded by the 'Institut National de la Recherche Agronomique', 'Région Lorraine' and support grants to Sébastien Duplessis and Nicolas Rouhier.

Author details

¹INRA/Nancy Université, Unité Mixte de Recherche 1136 'Interactions Arbres/Micro-organismes', Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France. ²Plant Research Laboratory, 122 Plant Biology Laboratory, Michigan State University, East Lansing, Michigan, 48864, USA.

Authors' contributions

BP and SD performed conceptual and experimental designs. BP carried out experimental procedures, *in silico* analyses and drafted the manuscript. IM compiled transcriptional data concerning *Populus-Melampsora* interactions from the literature. SD and NR supervised the work and helped with conceptual design and data analysis. All authors participated in depth reading and revising the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 3 September 2010 Accepted: 15 February 2011

Published: 15 February 2011

References

1. Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ: Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol* 2006, **44**:135-62.
2. Dodds PN, Rathjen JP: Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 2010, **11**:538-548.
3. Van Der Wel H, Loeve K: Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem* 1972, **31**:221-225.
4. Brandazza A, Angeli S, Tegoni M, Cambillau C, Pelosi P: Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals. *FEBS Letters* 2004, **572**:3-7.
5. Sakamoto Y, Watnabe H, Nagai M, Nakade K, Takahashi M, Sato T: *Lentinula edodes tlg1* Encodes a Thaumatin-Like Protein That Is Involved in Lentinan Degradation and Fruiting Body Senescence. *Plant Physiol* 2006, **141**:793-801.
6. Shatters RG Jr, Boykin LM, Lapointe SL, Hunter WB, Weathersbee AA: Phylogenetic and Structural Relationships of the PR5 Gene Family Reveal an Ancient Multigene Family Conserved in Plants and Select Animal Taxa. *J Mol Evol* 2006, **63**:12-29.
7. Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM: The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 2010, **29**:419-436.
8. Mukherjee AK, Carp MJ, Zuchman R, Ziv T, Horwitz BA, Gepstein S: Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *Journal of Proteomics* 2010, **73**:709-720.
9. Islam MA, Sturrock RN, Holmes A, Ekramoddoullah AKM: Ultrastructural studies of *Phellinus sulphurascens* infection of Douglas-fir roots and immunolocalization of host pathogenesis-related proteins. *Mycol Res* 2009, **113**:700-712.
10. Wang X, Tang C, Deng L, Cai G, Liu X, Han Q, Buchenauer H, Wei G, Han D, Huang L, Kang Z: Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene *TaPR5* from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiol Plant* 2010, **139**:27-38.
11. Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP: A new family of plant antifungal proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 1991, **4**:315-23.
12. Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, Goesaert H, Brijs K, Beaugrand J, Volckaert G, Van Campenhout S, Proost P, Courtin CM, Delcour JA: TLX1, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochem J* 2007, **403**:583-591.
13. Schimoler-O'Rourke R, Richardson M, Selitrennikoff CP: Zeamatin Inhibits Trypsin and α -Amylase Activities. *Appl Env Microbiol* 2001, **67**:2365-2366.
14. Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA: Osmotin Is a

- Homolog of Mammalian Adiponectin and Controls Apoptosis in Yeast through a homolog of Mammalian Adiponectin Receptor. *Mol Cell* 2005, **17**:171-180.
15. Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DSC: Antifreeze Proteins in Winter Rye Similar to Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiol* 1995, **109**:879-889.
 16. Rajam MV, Chandola N, Saiprasad Goud P, Singh D, Kashyap V, Choudhary ML, Sihachakr D: Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogen as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Biol Plant* 2007, **51**:135-141.
 17. Ghosh R, Chakrabarti C: Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta* 2008, **228**:883-890.
 18. Fierens E, Gebruers K, Courtin CM, Delcour JA: Xylanase Inhibitors Bind to Nonstarch Polysaccharides. *J Agri Food Chem* 2008, **56**:564-570.
 19. Fierens E, Gebruers K, Voet ARD, De Maeyer M, Courtin CM, Delcour JA: Biochemical and structural characterization of TLX1, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. *J Enz Inhibit Med Chem* 2009, **24**:646-654.
 20. Liu JJ, Zamani A, Ekramoddoullah AKM: Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine. *Planta* 2010, **231**:637-651.
 21. Koiba H, Kato H, Nakatsu T, Oda J, Yamada Y, Sato F: Crystal Structure of Tobacco PR-5d Protein at 1.8 Å Resolution Reveals a Conserved Acidic Cleft Structure in Antifungal Thaumatin-Like Proteins. *J Mol Biol* 1999, **286**:1137-1145.
 22. Vandermarliere E, Lammens W, Schoepe J, Rombouts S, Fierens E, Gebruers K, Volckaert G, Rabijns A, Delcour JA, Strelkov SV, Courtin CM: Crystal structure of the noncompetitive xylanase inhibitor TLX1, member of the small thaumatin-like protein family. *Proteins* 2010, **78**:2391-2394.
 23. Wang X, Zafian P, Choudhary M, Lawton M: The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1996, **93**:2598-2602.
 24. Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, et al: The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 2006, **313**:1596-1604.
 25. Pinon J, Frey P: Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In *Rust Diseases of Willow and Poplar*. Edited by: MH Pei and AR McCracken. CAB International, Wallingford; 2005:139-154.
 26. Duplessis S, Major I, Martin F, Séguin A: Poplar and Pathogen Interactions: Insights from *Populus* Genome-Wide Analyses of Resistance and Defense Gene Families and Gene Expression Profiling. *Crit Rev Plant Sci* 2009, **28**:309-334.
 27. Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F, Duplessis S: Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiol* 2007, **144**:347-366.
 28. Street NR, Tsai CJ: *Populus* Resources and Bioinformatics. In *Genetics and Genomics of Populus*. Edited by: S Jansson. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models; .
 29. Phytozome portal. [http://www.phytozome.net/].
 30. Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, Bohlmann J, Constabel CP: The Transcriptional Response of Hybrid Poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* Leaf Rust Involves Induction of Flavonoid Pathway Genes Leading to the Accumulation of Proanthocyanidins. *Mol Plant Microbe Interact* 2007, **20**:816-83147.
 31. Azaiez A, Boyle B, Levée V, Séguin A: Transcriptome Profiling in Hybrid Poplar Following Interactions with *Melampsora* Rust Fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 2009, **22**:190-200.
 32. NCBI database. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/].
 33. Hanks SK, Quinn AM: Protein Kinase Catalytic Domain Sequence Database: Identification of Conserved Features of Primary Structure and Classification of Family Members. *Methods Enzymol* 1991, **200**:38-62.
 34. Yang X, Kalluri UC, Difazio SP, Wullschlegler SD, Tschaplinski TJ, Cheng ZM, Tuskan GA: Poplar Genomics: State of the Science. *Crit Rev Plant Sci* 2009, **28**:285-308.
 35. Burdon JJ, Thrall PH: Coevolution of Plants and Their Pathogens in Natural Habitats. *Science* 2009, **324**:755-756.
 36. Kohler A, Rinaldi C, Duplessis S, Baucher M, Geelen D, Duchaussoy F, Meyers BC, Boerjan W, Martin F: Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Mol Biol* 2008, **66**:619-636.
 37. Paterson AH, Freeling M, Tang H, Wang X: Insights from the Comparison of Plant Genome Sequences. *Annu Rev Plant Biol* 2010, **61**:349-372.
 38. Ellegren H: Comparative genomics and the study of evolution by natural selection. *Mol ecol* 2008, **17**:4586-4596.
 39. Zhao JP, Su XH: Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*. *Planta* 2010, **232**:949-962.
 40. Misas-Villamil JC, van der Hoorn RAL: Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr Opin Plant Biol* 2008, **11**:380-388.
 41. Monteiro S, Barakat M, Picarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB: Osmotin and Thaumatin from Grape: A Putative General Defense Mechanism Against Pathogenic Fungi. *Biochem Cell Biol* 2003, **93**:1505-1512.
 42. Arabidopsis eFP Browser. [http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi].
 43. O'Leary SJB, Poullis BAD, Von Aderkas P: Identification of two thaumatin-like proteins (TLPs) in the pollination drop of hybrid yew that may play a role in pathogen defence during pollen collection. *Tree Physiol* 2007, **27**:1649-1659.
 44. Capelli N, Diogon T, Greppin H, Simon P: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 1997, **191**:51-56.
 45. Kim YS, Park JY, Kim KS, Ko MK, Cheong SJ, Oh JB: A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruit used as molecular marker in probing resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Mol Biol* 2002, **49**:125-135.
 46. Tattersall DB, van Heeswijk R, Hoj PB: Identification and Characterization of a Fruit-Specific, Thaumatin-Like Protein That Accumulates at Very High Levels in Conjunction with the Onset of Sugar Accumulation and Berry Softening in Grapes. *Plant Physiol* 1997, **114**:759-769.
 47. Dafoe NJ, Gowen BE, Constabel P: Thaumatin-like proteins are differentially expressed and localized in phloem tissues of hybrid poplar. *BMC Plant Biology* 2010, **10**:191.
 48. Zedek F, Smerda J, Smarda P, Bures P: Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. *BMC Plant Biol* 2010, **10**:265.
 49. Menu-Bouaouiche L, Vriet C, Peumans WJ, Barre A, Van Damme EJM, Rougé P: A molecular basis for the endo- β -1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* 2003, **85**:123-131.
 50. Palacin A, Tordesillas L, Gamboa P, Sanchez-Monge R, Cueast-Herranz J, Sanz ML, Barber D, Salcedo G, Diaz-Perales A: Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin Exp Allergy* 2010, **40**:1422-1430.
 51. Guo Z, Bonos S, Meyer WA, Day PR, Belanger FC: Transgenic creeping bentgrass with delayed dollar spot symptoms. *Mol Breeding* 2003, **11**:95-101.
 52. Chen X, Shang J, Chen D, Lei C, Zou Y, Zhai W, Liu G, Xu J, Ling Z, Ma B, Wang Y, Zhao X, Zhu L: A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J* 2006, **46**:794-804.
 53. Yin TM, Difazio SP, Gunter LE, Jawdy SS, Boerjan W, Tuskan GA: Genetic and physical mapping of *Melampsora* rust resistance in *Populus* and characterization of linkage disequilibrium and flanking genomic sequence. *New Phytol* 2004, **164**:95-105.
 54. Giri website. [http://www.girinst.org/censor/].
 55. Joint Genome Institute. [http://www.jgi.doe.gov/].
 56. Broad Institute. [http://www.broadinstitute.org/].
 57. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1596-1599.
 58. PopGenIE: The Populus Genome Integrative Explorer. [http://www.popgenie.org/].
 59. Sjödin A, Street NR, Sandberg G, Gustafsson P, Jansson S: PopGenIE: The Populus Genome Integrative Explorer. A new tool for exploring the *Populus* genome. *New Phytol* 2009, **182**:1013-1025.
 60. PROTiCdb. [http://www.cbib.u-bordeaux2.fr/outils/Protic/home/].
 61. Ferry-Dumazet H, Houel G, Montalent P, Moreau L, Langella O, Negroni L, Vincent D, Lalanne C, de Daruvar A, Plomion C, Zivy M, Joets J: PROTiCdb:

- A web-based application to store, track, query, and compare plant proteome data. *Proteomics* 2005, **5**:2069-2081.
62. Hogue CW: Cn3D: a new generation of three-dimensional molecular structure viewer. *Trends Biochem Sci* 1997, **8**:314-316.
 63. Hacquard S, Delaruelle C, Legué V, Kohler A, Frey P, Martin F, Duplessis S: Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophic and sporulation phase. *Mol Plant Microbe Interact* 2010, **23**:1275-1286.
 64. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:2002-2007.
 65. Dafoe NJ, Zamani A, Ekramoddoullah AKM, Lippert D, Bohlmann J, Constabel CP: Analysis of the Poplar Phloem Proteome and Its Response to Leaf Wounding. *J Proteome Res* 2008, **8**:2341-2350.
 66. Dafoe NJ, Constabel CP: Proteomic analysis of hybrid poplar xylem sap. *Phytochemistry* 2009, **70**:856-853.
 67. Du J, Xie HL, Zhang DQ, He XQ, Wang MJ, Li YZ, Cui KM, Lu MZ: Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. *Proteomics* 2006, **6**:881-895.
 68. Christopher ME, Miranda M, Major IT, Constabel CP: Gene expression profiling of systematically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta* 2004, **219**:936-947.
 69. Gupta P, Duplessis S, White H, Karnosky DF, Martin F, Podila GK: Gene expression patterns of trembling aspen trees following long-term exposure to interacting elevated CO₂ and tropospheric O₃. *New Phytol* 2003, **167**:129-142.
 70. Bogeat-triboulot MB, Brosché M, Renaut J, Jouve L, Le Thiec D, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T, Altman A, Hausman JF, Polle A, Kangasjärvi J, Dreyer E: Gradual Soil Water Depletion Results in Reversible Changes of Gene Expression, Protein Profiles, Ecophysiology, and Growth Performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in Arid Regions. *Plant Physiol* 2007, **143**:876-892.
 71. Guerra F, Duplessis S, Kohler A, Martin F, Tapia J, Lebed P, Zamudio F, González E: Gene expression analysis of *Populus deltoides* roots subjected to copper stress. *Env Exp Bot* 2009, **67**:335-344.
 72. Phobius: A combined transmembrane topology and signal peptide predictor. [http://phobius.sbc.su.se/].
 73. Hu X, Reddy ASN: Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol Biol* 1997, **34**:949-959.
 74. García-Casado G, Collada C, Allona I, Soto A, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Gomez L, Aragoncillo C: Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiol Plant* 2000, **110**:172-180.
 75. Wang L, Duman JG: A Thaumatin-like Protein from Larvae of the Beetle *Dendroides canadensis* Enhances the Activity of Antifreeze Proteins. *Biochemistry* 2006, **45**:1278-1284.
 76. Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, Peterbauer C, Campillo N, Witty M, Kolarich D, Steinkellner H, Scheiner O, Breiteneder H: Plant-based Heterologous Expression of Mal d 2, a Thaumatin-like Protein and Allergen of Apple (*Malus domestica*), and its Characterization as an Antifungal Protein. *J Mol Biol* 2003, **329**:721-730.
 77. Barre A, Peumans WJ, Menu-Bouaouiche L, Van Damme EJM, May GD, Fernandez Herrera A, Van Leuven F, Rougé P: Purification and structural analysis of an abundant thaumatin-like protein from ripe banana fruit. *Planta* 2000, **211**:791-799.
 78. Leone P, Menu-Bouaouiche L, Peumans WJ, Payan F, Barre A, Roussel A, Van Damme EJM, Rougé P: Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. *Biochimie* 2006, **88**:45-52.
 79. Grenier J, Potvin C, Trudel J, Asselin A: Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β-1,3-glucans. *Plant J* 1999, **19**:473-480.
 80. Woloshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Buurlage M, van den Elzen PJM, Cornelissen BJC: Pathogen-Induced Proteins with Inhibitory Activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 1991, **3**:619-628.
 81. Narasimhan ML, Damsz B, Coca MA, Ibeas JI, Yun DJ, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA: A plant Defense Response Effector Induces Microbial apoptosis. *Mol Cell* 2001, **8**:921-930.
 82. D'Angeli S, Altamura MM: Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organisation. *Planta* 2007, **225**:1147-1163.
 83. Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA: Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 1996, **118**:11-23.
 84. Ibeas JI, Yun DJ, Damsz B, Narasimhan ML, Uesono Y, Ribas JC, Lee H, Hasegawa PM, Bressan RA, Pardo JM: Resistance to the plant PR-5 protein osmotin in the model fungus *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the regulatory effects of SSD1 on cell wall composition. *Plant J* 2001, **25**:271-280.
 85. Min K, Ha SC, Hasegawa PM, Bressan RA, Yun DJ, Kim KK: Crystal Structure of Osmotin, a Plant Antifungal Protein. *Proteins* 2004, **54**:170-173.
 86. Koiwa H, Kato H, Nakatsu T, Oda J, Yamada Y, Sato F: Purification and Characterization of Tobacco Pathogenesis-Related Protein PR-5d, an Antifungal Thaumatin-like Protein. *Plant Cell Physiol* 1997, **38**:783-791.
 87. Velazhahan R, Muthukrishnan S: Transgenic tobacco plants constitutively overexpressing a rice thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to *Alternaria alternata*. *Biol Plant* 2003, **47**:347-354.
 88. Dall'Antonia Y, Pavkov T, Fuchs H, Breiteneder H, Keller W: Crystallization and preliminary structure determination of the plant food allergen Pru av 2. *Acta Cryst* 2005, **61**:186-188.
 89. Newton SS, Duman JG: An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol* 2000, **44**:581-589.
 90. Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L, Peña L: Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol Breeding* 2001, **7**:175-185.
 91. Pressey R: Two isoforms of NP24: A Thaumatin-Like Protein in Tomato Fruit. *Phytochemistry* 1997, **44**:1241-1245.
 92. Campos M de A, Silva MS, Magalhaes CP, Ribeiro SG, Sarto RPD, Vieira EA, Grossi de Sa MF: Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. *Microbe Cell Fact* 2008, **7**:7.
 93. Ogata CM, Gordon PF, de Vos AM, Kim SH: Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å Resolution. *J Mol Biol* 1992, **228**:893-908.
 94. Schestibratov KA, Dolgov SV: Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Sci Hortic* 2005, **106**:177-189.
 95. Kuwabara C, Takezawa D, Shimada T, Hamasa T, Fujikawa S, Arakawa K: Abscisic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiol Plant* 2002, **115**:101-110.
 96. Altincicek B, Knorr E, Vilcinskis A: Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Dev Comp Immunol* 2008, **32**:585-595.
 97. Roberts WK, Selitrennikoff CP: Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen Microbiol* 1990, **136**:1771-1778.
 98. Huynh QK, Borgmeyer JR, Zobel JF: Isolation and Characterization of a 22 kDa Protein with Antifungal Properties from Maize Seeds. *Bioch Biophys Res Com* 1992, **182**:1.
 99. Batalia MA, Monzingo AF, Ernst S, Roberts W, Robertus JD: The crystal structure of the antifungal protein Zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nat Struct Biol* 1996, **3**:19-23.

doi:10.1186/1471-2229-11-33

Cite this article as: Petre et al.: Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biology* 2011 **11**:33.

CHAPITRE IV : Analyse génomique et transcriptomique de receptor-like proteins (RLP) chez le peuplier et identification de la protéine Risp comme nouvel éliciteur du système immunitaire chez le peuplier

CHAPITRE IV

Analyse génomique et transcriptomique de receptor-like proteins (RLP) chez le peuplier et identification de la protéine Risp comme nouvel éliciteur du système immunitaire chez le peuplier

Résumé du chapitre IV

Analyse génomique et transcriptomique de receptor-like proteins (RLP) chez le peuplier et identification de la protéine Risp comme nouvel éliciteur du système immunitaire chez le peuplier

Les plantes régulent leur immunité et leur développement grâce à des récepteurs membranaires tels que les receptor-like proteins (RLP), capables de reconnaître des peptides endogènes extracellulaires. Malgré d'importantes recherches menées par des approches génétiques sur les nombreux RLP d'arabidopsis, très peu ont été caractérisés, de même que peu d'éliciteurs endogènes peptidiques ont été décrits.

Durant la thèse, nous avons constaté que le gène codant la protéine Risp (protéine alors étudiée pour ses propriétés antifongiques, voir chapitre V), qui est le gène dont l'expression est la plus fortement induite lors de l'interaction incompatible avec *M. larici-populina*, est associée à un gène codant un RLP dans le génome de *P. trichocarpa*. De manière surprenante, nous avons observé par la suite que la plupart des gènes codant des RLP chez le peuplier sont physiquement associés à des gènes codants des petites protéines de fonction inconnue. Nous avons émis l'hypothèse que ces petites protéines peuvent potentiellement être des ligands (ou des précurseurs de ligands) endogènes des RLP associés. Ainsi, nous avons initié une analyse systématique des gènes *RLP* et de leur voisinage génomique, suivie d'une analyse transcriptomique pour laquelle nous avons utilisé les données présentées dans le chapitre II, que nous avons comparé à une cinétique d'infection identique, mais réalisée sur des feuilles entières au lieu de disques foliaires. De ce fait, nous avons pu mesurer l'effet de la blessure induite suite à la formation des disques foliaires et ainsi cribler les couples RLP/ligands candidats induits par la blessure. Cela nous a permis de montrer que le gène *Risp* est fortement induit suite à une blessure, et qu'un *RLP* possiblement associé est fortement exprimé dans les feuilles et légèrement induit lors de la blessure. Nous avons ensuite pu montrer que la protéine recombinante Risp induit une alcalinisation de cultures cellulaires de peuplier, traduisant une induction de réponses de défense. Nous discutons le fait que Risp puisse être un nouvel éliciteur endogène des réponses de défense chez le peuplier.

Ce chapitre de thèse est composé d'un article de recherche en préparation et quasiment finalisé, rédigé en anglais et intitulé '***Genome-wide analysis of RLPs and physically-associated genes in poplar unravels a novel endogenous peptide elicitor***', et dont je suis le premier auteur. Nous comptons le soumettre pour publication à la revue 'New Phytologist' au format 'Rapid Report'. A l'occasion de ce projet, j'ai effectué deux séjours d'un mois chacun dans le laboratoire d'Armand Séguin au Centre de Foresterie des Laurentides (Québec, Canada) où j'ai pu réaliser les tests d'alcalinisation des cultures cellulaires de peuplier, en collaboration étroite avec Hugo Germain (alors post-doctorant au laboratoire, maintenant professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières au Canada).

Article n°4 : Genome-wide analysis of *RLPs* and physically-associated genes in poplar unravels a novel endogenous peptide elicitor

Benjamin Petre, Hugo Germain, Arnaud Hecker, Armand Séguin, Sébastien Duplessis, Nicolas Rouhier

Article préparé pour être soumis à la revue *New Phytologist*, selon un format court type 'Rapid Report'

Six fichiers de matériel supplémentaires sont associés à l'article :

- les quatre figures supplémentaires sont disposées à la fin de l'article
- le texte et la table supplémentaires sont fournis en version électronique

Genome-wide analysis of *RLPs* and physically-associated genes in poplar unravels a novel endogenous peptide elicitor

Benjamin Petre¹, Hugo Germain², Arnaud Hecker¹, Armand Séguin³, Sébastien Duplessis^{1*}, Nicolas Rouhier^{1*}

¹Université de Lorraine, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences BP 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, France

²Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada

³Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre, 1055 du PEPS, PO Box 10380, Stn Sainte-Foy, Québec, QC, G1V 4C7, Canada

Correspondence:

Dr. Sébastien Duplessis

INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

duplessi@nancy.inra.fr ; + 33 3 83 39 40 13

Pr. Nicolas Rouhier

Université de Lorraine, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences BP 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, France

Nicolas.Rouhier@scbiol.uhp-nancy.fr ; ++ 33 3 83 68 42 25

ABSTRACT

- In plants, cell-surface receptors control immunity and development through the recognition of extracellular dogenous peptide, generally cleaved from precursors. Cell-surface receptor-like proteins (RLPs) evolved as a large multigene family in plants and, despite many efforts, remain poorly characterized.
- *In silico* genome analyses, transcriptomic and cell culture alkalisation assays were combined to describe the *RLP* gene family as well as a novel endogenous peptide elicitor in poplar.
- In poplar and arabidopsis genomes, *RLP* genes are very often clustered with genes encoding small proteins of unknown function (*SPUF*), which could represent potential endogenous ligands. In poplar, wounding induced the expression of a RLP-associated *SPUF* gene named *RISP*. Recombinant *RISP* induced cell culture alkalisation, a hallmark of plant defense response activation. Moreover, western blot experiments suggested that *RISP* might be cleaved upon leaf excision.
- Using genomic and transcriptomic analyses, we identified a novel endogenous peptide that activates immune response in poplar. This approach, different from previous classical genetic screens, may help characterizing new endogenous peptides and their receptors in plants.

INTRODUCTION

Plants possess cell-surface receptors able to recognize extracellular molecules for subsequent intracellular signaling (Monaghan and Zipfel, 2012). Canonical receptor-like proteins (RLPs) typically present a large extracellular leucine-rich repeat (LRR) domain, a single transmembrane domain and a short cytoplasmic tail. Despite extensive genetic studies, the function of almost all of the 57 RLP identified in the model plant *Arabidopsis thaliana* remains unknown (Fritz-Laylin *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). The handful of RLP characterized to date are able to perceive proteinaceous ligands and then trigger signaling cascades that control plant immunity or development (Jones *et al.*, 1994; de Jonge *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 1999).

In plants, several cell-surface receptor ligands are endogenous small proteins or peptides that are released in the apoplast and function as hormones (Butenko *et al.*, 2009). Most are cleaved from small precursors (< 200 aa) of unknown function. Surprisingly, many precursors lack identifiable secretion signals and how cleaved peptides are ultimately released in the apoplast remains undetermined. Peptides able to induce immune responses are referred to as endogenous peptide elicitors and are commonly identified from plant extracts due to their ability to induce the alkalinization of plant cell cultures, a hallmark of the activation of the immune system (Ryan and Pearce, 2003; Yamaguchi and Huffaker, 2011).

In prokaryotes, genes with functional connections are often gathered in operons and are co-transcribed, which is far less systematic in eukaryotes. However, the presence in plants of operon-like clusters of secondary metabolism genes quite well illustrate that physical association of genes can also reflect functional links between gene products (Kliebenstein and Osbourn, 2012). In addition, in tomato the *Prf* gene clusters with several *Pto* resistance genes and it has been shown that the proteins physically interact (Rosebrock *et al.*, 2007).

In this study, we have identified candidate RLP/endogenous ligand couples in poplar by combining genomic, transcriptomic and cell culture alkalinisation approaches. Essentially, we are reporting that RISP, a small-secreted protein whose transcripts are induced during poplar infection by the rust fungus *Melampsora larici populina*, represents a novel endogenous elicitor of plant defense responses.

RESULTS AND DISCUSSION

The poplar RLP gene family likely evolved recently by tandem duplication

A total of 82 *RLP* genes having similarity with tomato Cf-9 were identified in the poplar genome sequence (Table 1; Table S1A). This value is in the range of those reported in *A. thaliana* (hereafter arabidopsis) and rice (57 and 90 respectively; Fritz-Laylin *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). In a phylogenetic tree inferred with poplar and arabidopsis *RLP*, sequences from each species gather within a few well-separated clades (Figure 1A), highlighting the divergence between the two species. Sixty-six and forty-five *RLP* genes are grouped into 23 and 11 clusters of up to 7 and 6 genes in poplar and arabidopsis respectively (Table 1). Interestingly, genomic organization correlates with phylogeny in both species, as *RLP* genes clustering in the genome sequence are gathered in the same phylogenetic clades (Figure 1). In accordance with previous observations made in rice and arabidopsis (Fritz-Laylin *et al.*, 2005), these results support a recent evolution of *RLP* genes by tandem duplication in higher plants.

RLP genes are closely associated to genes encoding species-specific small proteins of unknown function

A careful investigation of *RLP*-associated genes in poplar and arabidopsis genomes identified 87 and 38 genes encoding small proteins of unknown function (SPUF) respectively (Table 1). *SPUF* genes represent 23% of all *RLP*-associated genes identified in poplar, and only 6% in arabidopsis. The nine most important clusters comprising at least 3 *SPUF* and 3 *RLP* genes in the poplar genome are depicted in Figure 1B. Among the 87 *RLP*-associated *SPUF* genes identified in poplar, 30 have no paralogs and 21 have less than two paralogs (Figure S1; Table 1). When paralogs were detected, genes were often closely associated in the genome, strongly suggesting that they arose along with tandem duplication events that drove *RLP* gene evolution. Interestingly, 53 *SPUF* are specific to poplar whereas the other 34 have divergent homologs in other plants (Table S1B). Due to the presence of partially conserved domains (e.g. NB-ARC, glycosyl hydrolase), a few *SPUF* have more paralogs and homologs in databases (Figure S1). The analysis of arabidopsis *SPUF* paralogs and homologs led to similar conclusions (Table 1; Table S1B; Figure S1). Altogether, these results prompted us to speculate that some *SPUF* could be endogenous ligands of the physically associated *RLP* gene products. Whereas ligands of cell-surface receptors are assumed to be extracellular, only 9 and 10 *SPUF* possess a signal peptide for apoplastic secretion in poplar and arabidopsis respectively (Table 1). However, the absence of identifiable secretion signal is commonly encountered for well-

characterized apoplastic peptide hormone precursors (Butenko *et al.*, 2009; Yamaguchi and Huffaker 2011).

Besides *SPUF*, thirty genes coding proteins comprising a restricted number of LRR-domains have been found in the vicinity of poplar *RLP* genes (Figure 2; Table S1A). Although we cannot completely exclude that these are mis-annotated or pseudo genes, it is tempting to consider those as reservoirs of diversity or relics of *RLP* gene evolution. Other *RLP*-associated genes of interest included some receptor-like kinases (RLKs), serine-threonine or lectin kinases in poplar (Table S1A) as well as few genes coding for defensins, lipid-transfer proteins or rapid-alkalinisation factors (RALF) in arabidopsis (Table S1C).

A SPUF is induced in poplar leaves upon wounding

Most cell-surface receptors involved in defense as well as endogenous peptide elicitor are induced upon stresses like wounding or pathogen attack (Kemmerling *et al.*, 2011; Yamaguchi and Huffaker, 2011). In order to identify some *RLP* and *SPUF* genes that could be induced in such conditions and thus likely participate to defense responses, transcript expression was followed in poplar wounded leaves (i.e. leaf disks) using genome oligoarrays. As expected, cutting out of leaf disks induced the expression of genes classically associated with wounding such as wound-response proteins, chitinases or protease inhibitors (Figure S2; Table S1D). Fifty-five *SPUF* genes presented a constitutive expression in leaves and only one was strongly induced in leaf disks (Figure 2A). As well, forty-four *RLP* genes presented very low levels of expression, except the transcript of *RLP9* (i.e. the *RLP* gene from chromosome 9) that was basally highly expressed in leaves and slightly induced by wounding (Figure 2B). The induced *SPUF* transcript, which has been previously identified as the most induced transcript during poplar resistance to leaf rust disease (Rinaldi *et al* 2007), encodes a predicted secreted protein that was referred to as rust-induced secreted protein (RISP).

RISP gene is located onto the small (~13kb), unresolved scaffold 580, whereas *RLP9* gene is located onto chromosome 9 (Figure 2C). Interestingly, *RLP* and *SPUF* genes from scaffold 580 and chromosome 9 are the closest respective paralogs in poplar. Taking into account that almost all phylogenetically-related *RLP* and *SPUF* genes are physically associated in the poplar genome, we suggested that the unresolved scaffold 580 could be in fact inserted in chromosome 9, in the vicinity of the paralogs. Thus, considering the induction of *RISP* transcript expression upon pathogen attack and wounding as well as

the co-regulation with the potentially physically associated *RLP9* gene upon wounding, *RISP* could represent a novel endogenous peptide elicitor of the poplar immune system, possibly acting as an extracellular ligand for RLP9.

RISP is able to induce the alkalization of poplar cell suspensions

RISP encodes a protein of 82 amino acids, with a predicted signal peptide of 22 amino acids. The mature protein present four cysteine residues and is predicted to have an intrinsically disordered fold (i.e. no fixed 3D structure). In order to investigate the ability of *RISP* to activate a component of the plant immune system, the mature form of *RISP* (i.e. without the predicted signal peptide) was produced as a recombinant protein in *Escherichia coli* and the purified protein was used in an alkalization assay of poplar cell cultures. Using a concentration of 1 μM of recombinant protein, a shift of 0.5 pH units (from 4.2 to a plateau at 4.7) was reached after 45 minutes (Figure 3A). A comparable alkalization of the same cell line elicited by a poplar RALF was previously reported, except that the observed pH of non-elicited cultures was around 3.7, what led to a shift of 1 pH unit (Haruta *et al.*, 2003) instead of *ca.* 0.5 pH units in our conditions. A significant alkalization has been observed up to a concentration of 10 nM of recombinant *RISP* (Figure 3B). This value is slightly higher than those usually reported for other peptides in cell cultures from different plant species (Yamaguchi *et al.*, 2011). However, considering that endogenous peptide elicitors are often processed by a plant-encoded mechanism to liberate the bioactive peptide (Germain *et al.*, 2006), the use of the entire protein (i.e. unprocessed) might account for the observed difference.

RISP is potentially processed in detached poplar leaves

Comparing the sequence of *RISP* with its *RISP*-like paralog on chromosome 9 (Figure 2C), we identified a fully conserved stretch of 12 amino acids (PGPNKPKKRCS) in the C-terminal region that is enriched in basic (4) and proline (3) residues (Figure S4), a property characteristic of several EPE (Yamaguchi and Huffaker, 2011). We initially speculated that this sequence could constitute the bioactive region of *RISP*. However, addition of the synthetic peptide corresponding to these 12 amino acids into poplar cell suspensions did not promote an alkalisation (Figure S4). To assess the possible cleavage of *RISP* in poplar leaves, *RISP* abundance was followed by western blotting, comparing poplar leaves collected from the whole plant with detached leaves placed on water for 24 hours, what can be perceived as a stress by plant tissues. Whereas *RISP* was detected in a soluble protein extract from the first condition, it was not in an extract

from detached leaves (Figure 3C). These observations may suggest that upon leaf excision a plant-encoded mechanism processes RISP and possibly releases a smaller bioactive peptide undetectable using our antibody.

CONCLUSION

The demonstrated transcript induction of *RISP* in wounded leaves and the activation of one response associated with plant immunity by the recombinant protein indicate that some SPUF may possess endogenous peptide elicitor properties. Besides, the existence of numerous physical associations between *RLP* and *SPUF* genes in the poplar genome suggests a possible direct interaction between encoded proteins, albeit the physical interaction between them remains to be clearly demonstrated and cell-surface receptor/ligand couples currently known are not encoded by physically associated genes. However, the approach employed here opens interesting perspectives to screen for RLP endogenous ligands in model plant systems, which could, considering the obstacles encountered by past genetic approaches, accelerate the discovery of RLP function and of novel endogenous peptides.

MATERIALS AND METHODS

Identification of RLP genes in the poplar genome, phylogeny and sequence analyses

RLP genes have been identified in the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome sequence, version 2.2, hosted on the Phytozome portal (see Table S1E for Internet links) by amino acid sequence homology searches using tomato Cf-9 protein sequence as a query. Only RLP genes presenting Cf-9 canonical domains and more than 20 LRR were considered (Fritz-Laylin *et al.*, 2005; Figure S3). Among the 82 *RLP* genes retained for the analysis, only two required a manual correction due to intron mis-prediction (Table S1A). For the phylogenetic analyses, we have retained the 45 strict Cf-9 homologs among the 57 *RLP* genes identified previously in *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2008) as well as three protein sequences from tomato (Cf-2, Cf-4 and Cf-9) retrieved from the Uniprot database. Only the conserved C3-D domain (Figure S3; Text S1; Fritz-Laylin *et al.*, 2005) of RLP sequences was used to build the phylogenetic tree on the Phylogeny website, by using default parameters (Muscle alignment, Gblocks curation, PhyML phylogenetic tree and SH-like approximate likelihood-ratio test for branch support). The tree was observed and edited in the FigTree v1.2.3 software. All protein-coding genes present in the 50kb

vicinity of poplar and arabidopsis *RLP* genes were inspected on the Phytozome portal. All genes coding for a small protein of unknown function, defined as proteins with a size below 200 amino acids and with no annotation available, were identified and 12 were curated for start and stop codons (Table S1B). Signal peptides for secretion were predicted with SignalP 4.0 and SecretomeP 2.0 server and amino acid sequence alignments were executed on the Multalin website. Poplar and arabidopsis SPUF paralogs have been searched in respective genome sequences by amino acid homology, whereas homologs in other plants as well as conserved domains have been searched in the non-redundant protein database at NCBI (Blastp, E-value < 10⁻¹⁰).

Poplar transcript expression analysis

Poplar genome oligoarray data obtained from hybrid poplar ‘Beaupré’ (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*) leaf disks (i.e. wound treatment) collected at six different time-points from 18 to 48 hours after inoculation with *Melampsora larici-populina* were compared with strictly identical experiments performed on entire leaves (i.e. non-wounded treatment; GSE34802 at NCBI GEO). Poplar cultivation and inoculation procedures have been carried out as previously reported (Rinaldi *et al.*, 2007). Isolation of total RNA, cDNA synthesis and oligoarrays were performed as previously described (Petre *et al.*, 2012). The average of the six conditions in each dataset has been considered for quantitative comparison of gene expression with Microsoft Excel and R. Poplar oligoarray data are presented in Table S1D.

Cloning, expression and purification of his₆-tagged RISP recombinant protein

The open reading frame encoding mature RISP (i.e. devoid of the 23 N-terminal amino acids constituting the predicted signal peptide) was amplified from *P. trichocarpa* leaf cDNA using specific primers (Table S1F) and cloned into the pET15b vector (Novagen) for the production of an N-terminal hexa-histidine (His₆)-tagged recombinant protein.

For recombinant protein production, the *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain was transformed with the recombinant plasmid. Bacterial growth, induction of protein expression, culture centrifugation as well as soluble protein isolation steps were performed as described in Couturier *et al* (2011). The his₆-tagged recombinant RISP was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC select affinity gel, Sigma). After loading the soluble extract, extensive washing was performed with a washing buffer and elution of recombinant proteins was carried out using a buffer supplemented in imidazole (for all buffer compositions, see Table S1G). The protein was then

concentrated and dialyzed 10,000 times by ultra-filtration against 30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0 buffer (TE). Protein purity was estimated by SDS-PAGE and its concentration was determined by spectrophotometry using a molar extinction coefficient at 280 nm of $1640 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and by the colorimetric BCA protein assay (Pierce).

Poplar cell suspension alkalization assay

Poplar cell suspensions (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*; H11-11 hybrid) were maintained in Murashige and Skoog medium by weekly transferring 10 ml of cells to 30 ml of fresh media. Cells were always maintained in dark conditions, at 20 °C and under shaking at 160 rpm. For the alkalization assay, cells were used 4 days after transfer. The day before each alkalization assay, 5 ml of cells were aliquoted in sterile opened falcon and allowed to equilibrate overnight. Prior to the alkalization assay, cultures in falcons equilibrated 2 additional hours under room-light conditions. A constant volume of 20 μL of recombinant proteins, TE buffer or PGPNKPKKRCES synthetic peptide (Genecust) adjusted to various concentrations as described in [Figure 3](#) and [Figure S4](#), was added and pH variations were recorded thereafter. TE buffer treatment remained stable at a pH of 4.2 and was used to calculate pH ratio presented in [Figure 3](#).

Leaf protein isolation and western blotting analyses

Frozen leaves were ground with a mortar and a pestle in liquid nitrogen. Soluble and insoluble protein isolation was performed as previously described ([Rouhier et al., 2004](#)) and protein were quantified and adjusted at 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in a Laemmli buffer, denatured 10 minutes at 95 °C and stored at -20 °C. For western blotting analyses, twenty micrograms of proteins were separated on 15 % SDS-PAGE and transferred on a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with the Odyssey blocking buffer (Li-Cor), incubations with primary (anti-RISP 1/250 dilution) and secondary antibodies (1/5000 dilution; IRDye 800CW, Li-Cor) were performed for one hour, separated by 5 x 1 minute of washing of the membrane with PBST buffer at pH 7.0. Revelation of the western blot was carried out on the Odyssey infrared imager (Li-Cor). Polyclonal antibodies raised in rabbit against recombinant RISP were purified from the immune serum by affinity chromatography as described previously ([Rouhier et al., 2001](#)). Pre-immune and depleted sera were used as controls to ensure the specificity of the signal ([data not shown](#)).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Cyril Zipfel at The Sainsbury Laboratory (UK) for the critical reading of the manuscript, Meriem Benchabane and Gervais Pelletier at the Laurentian Forestry Centre (Canada) for their help with poplar cell suspensions, Francis Martin and Annegret Kohler at INRA Nancy (France) for poplar oligoarrays and help with oligoarray data analysis, Pascal Frey, Bénédicte Fabre and Patrice Vion at INRA Nancy (France) for advices on poplar culture, technical help in green-houses and for providing rust fungus isolates. This work was founded by INRA and Région Lorraine grants to Sébastien Duplessis and Nicolas Rouhier. Benjamin Petre was supported by a young scientist grant (CJS) from INRA.

REFERENCES

- Butenko MA, Kjersti Vie A, Brembu T, Aalen RB, Bones AM. 2009.** Plant peptides in signaling: looking for new partners. *Trends in Plant Science*. **5**: 255-263
- Couturier J, Ströher E, Albetel A-L, Roret T, Muthuramalingam M, Tarrago L, Seidel T, Tsan P, Jacquot J-P, Johnson MK, Dietz K-J, Didierjean C, Rouhier N. 2011.** *Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins. *Journal of Biological Chemistry*. **286**: 27515-27527
- Fritz-Laylin LK, Krishnamurthy N, Tör M, Sjölander KV, Jones JDG. 2005.** Phylogenomic Analysis of the Receptor-Like Proteins of Rice and Arabidopsis. *Plant Physiology*. **138**: 611-623
- Germain H, Chevalier E, Matton DP. 2006.** Plant bioactive peptides: an expanding class of signaling molecules. *Canadian Journal of Botany*. **84**: 1-19
- Haruta M, Constabel CP. 2003.** Rapid Alkalinization Factors in Poplar Cell Cultures. Peptide Isolation, cDNA Cloning, and Differential Expression in Leaves and Methyl Jasmonate-Treated Cells. *Plant Physiology*. **131**: 814-823
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA. 2006.** An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **103**: 10098-10103
- Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE. 1999.** The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *The Plant Cell*. **11**: 1925-1934

- Jones DA, Thomas CM, Hamond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG. 1994.** Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*. **266**: 789-793
- de Jonge R, van Esse HP, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Keykha Saber M, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV, Thomma BPHJ. 2012.** Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **109**: 5110-5115
- Kliebenstein DJ, Osbourn A. 2012.** Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **15**: 1-9
- Monaghan J, Zipfel C. 2012.** Plant pattern recognition receptors complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*. **15**: 1-9
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA. 1991.** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitors proteins. *Science*. **853**: 895-897
- Petre B, Morin E, Tisserant E, Hacquard S, Da Silva C, Poulain J, Delaruelle C, Rouhier N, Martin F, Kohler A, Duplessis S. 2012.** RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers *PtSultr3;5*, a fungal-induced host sulfate transporter. *PLoS ONE*, accepted
- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F, Duplessis S. 2007.** Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology*. **144**:347-366
- Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F, Martin GB. 2007.** A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*. **448**: 370-374
- Rouhier N, Gelhaye E, Sautiere P-E, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, de Fäy E, Meyers Y, Jacquot J-P. 2001.** Isolation and Characterization of a New Peroxiredoxin from Poplar Sieve Tubes That Uses Either Glutaredoxin or Thioredoxin as a Proton Donor. *Plant Physiology*. **127**: 1299-1309
- Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto J, Jordy M-N, de Fäy E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire S, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot J-P. 2004.** Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense. *Plant Physiology*. **134**: 1-12

Ryan CA, Pearce G. 2003. Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **100**: 14577-14580

Wang G, Ellendorf U, Kemp B, Mansfield JW, Forsyth A, Mitchell K, Bastas K, Liu C-M, Woods-Tör A, Zipfel C, de Wit PJGM, Jones JDG, Tör M, Thomma BPHJ. 2008. A Genome-Wide Functional Investigation into the Roles of Receptor-Like Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology.* **147**: 503-517

Yamaguchi Y, Barona G, Ryan CA, Pearce G. 2011. GmPep914, an Eight-Amino Acid Peptide Isolated from Soybean Leaves, Activates Defense-Related Genes. *Plant Physiology.* **156**: 932-942

Yamaguchi Y, Huffaker A. 2011. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology.* **14**: 1-7

TABLES

Table 1. RLP and RLP-associated SPUF genes in poplar and arabidopsis.

	poplar	arabidopsis
<i>RLP</i> genes	82	45
<i>SPUF</i> genes	87	38
<i>RLP</i> -associated genes [avg. per <i>RLP</i> gene]	375 [4.75 ± 2.1]	597 [13.3 ± 3.7]
% of <i>SPUF</i> genes compared with the total no. of <i>RLP</i> -associated genes	23.2	6.4
<i>RLP</i> genes clustered [no. of clusters]	66 [23]	29 [11]
<i>SPUF</i> with prediction for secretion	9	10
<i>SPUF</i> without paralogs	31	21
<i>SPUF</i> with 1 or 2 paralogs	20	11
<i>SPUF</i> without homologs in other plants	34	29

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Poplar and arabidopsis RLP and RLP/SPUF gene clusters in poplar genome. (A) The phylogenetic tree was built with RLP protein sequences from poplar, arabidopsis and Cf-2, Cf-4 and Cf-9 from tomato (green, blue and red bars respectively). Shaded areas indicate clades in which clusters of *RLP* genes gather, cluster references are indicated nearby (in bold), as well as the number of genes coding RLP and SPUF (separated by a slash) that are part of the cluster. (B) Clusters and super-clusters integrating at least 3 *RLP* and 3 *SPUF* genes are depicted at scale. In the legend, values facing the dots refer to the average level of expression in poplar leaves (Table S1D). For the supercluster 3, the arbitrary cut-off of 50 kb investigated for *RLP-associated SPUF* genes has been extended downstream of some *RLP* gene.

Figure 2. RISP gene and its associated RLP gene are induced in poplar leaves upon wounding. Average levels of expression at six time-points measured in poplar leaves (non-wounded condition) and in excised leaf disks (wounded condition) with oligoarrays are compared for the considered *RLP* (A) and *SPUF* (B) genes. Error bar: SE, n=6. The complete transcriptome dataset is available in Table S1D. (C) *RISP* and *RLP* genes from scaffold 580 (Phytozome ID Poptr_0580s00210 and Poptr_0580s00200 respectively) are the closest paralogs of *RISP-Like* and *RLP* genes from chromosome 9 (Phytozome ID Poptr_0009s11500 and Poptr_0009s11510 respectively). The pink arrow indicates *RISP* gene location in the non-yet publicly released assembly of the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome (version 3.0).

Figure 3. RISP is able to activate a component of the plant immune system and is likely cleaved in planta upon leaf detaching. (A) Mature RISP recombinant protein was added to poplar cell suspensions (variety H11-11) at a concentration of 1 μ M and the pH was recorded at regular times as indicated. Error bars: SE, n=3. (B) Different concentrations of recombinant RISP were added to poplar cell suspensions and the pH was recorded after 30 minutes. Error bars: SE, n=3. (C) Western blot showing the expression of RISP in poplar leaves collected directly from the tree or detached and maintained on water for 24 h. Recombinant RISP has an atypical SDS-PAGE migration profile at ~12 kDa instead of the expected 8 kDa. The his₆-tag in the recombinant protein likely accounts for the slight shift observed between the recombinant protein and the signal in the poplar leaf extracts.

ADDITIONAL INFORMATION

Figure S1. Poplar and arabidopsis SPUF paralogs. Poplar (A) and arabidopsis (B) SPUF sequences were used for homology searches against the respective predicted proteome on the Phytozome portal. The dataset used, homology searches details and homologs identified in other plants are detailed in [Table S1B](#).

Figure S2. Wounding effect in poplar leaf disks compared with entire leaves. The average expression values of the 6 conditions in the wounded and non-wounded dataset are presented as a dot plot with log-scale axes. All expression values are presented in [Table S1D](#). The red rectangle indicates the wound-induced genes annotated in [Table S1D](#) and discussed in the text.

Figure S3. Protein alignment of poplar RLP and tomato Cf-9. Canonical domains identified in Cf-9-like RLP by [Fritz-Laylin and colleagues \(2005\)](#) are indicated, as well as the conserved C3-D domain used for the phylogenetic analysis presented in [Figure 1A](#).

Figure S4. RISP and RISP-LIKE possess a conserved stretch of 12 amino acids within their C-terminal region. (A) Alignment of RISP and RISP-LIKE protein sequences. The horizontal black bar indicates the fully conserved stretch of 12 amino acids. The black arrow indicates the cleavage site for the RISP signal peptide. (B) The synthetic peptide corresponding to these 12 amino acids was added to poplar cell suspensions and pH was measured after 30 minutes.

Table S1. Supplemental informations and datasets. (Sheet A) Details about *Cf-9-like RLP* and associated *SPUF* genes identified in poplar and arabidopsis. (Sheet B) *SPUF* sequences and paralogs in poplar and arabidopsis as well as homologs in other plants. (Sheet C) genes encoding small-secreted proteins of interest identified in the vicinity of arabidopsis *RLP* genes. (Sheet D) Oligoarray dataset and wound-induced genes in leaf disks compared with entire leaves. (Sheet E) Internet links. (Sheet F) Primers and His₆-tagged RISP recombinant protein sequence. (Sheet G) Buffers used for recombinant protein purification.

Text S1. Conserved RLP domain (C3-D) used for phylogenetic analyses. The C3-D domain from RLP of poplar (82 sequences), arabidopsis (45 sequences) and tomato (Cf-2, Cf-4 and Cf-9) used to build the phylogenetic tree depicted in [Figure 1](#) are presented in fasta format.

Figure 1

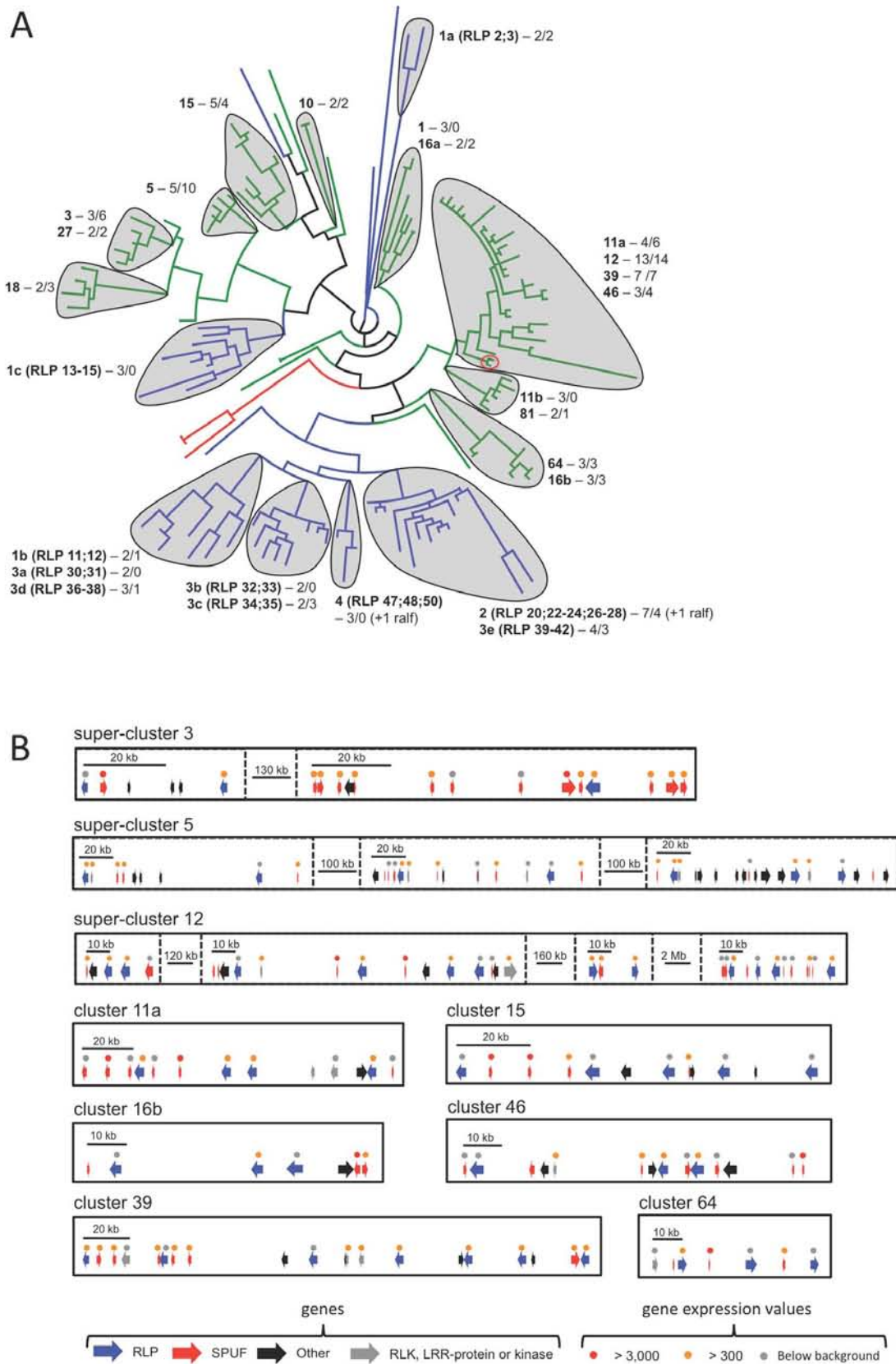


Figure 2

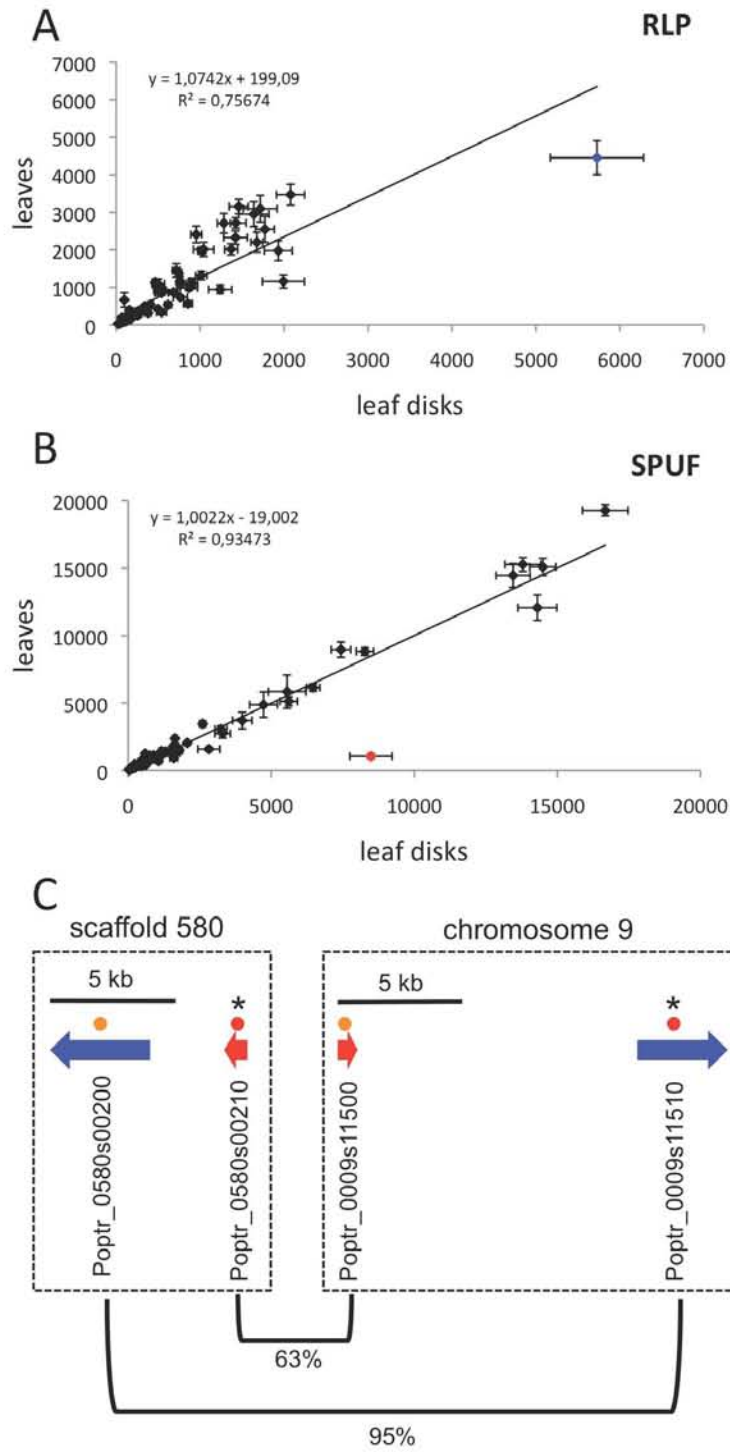


Figure 3

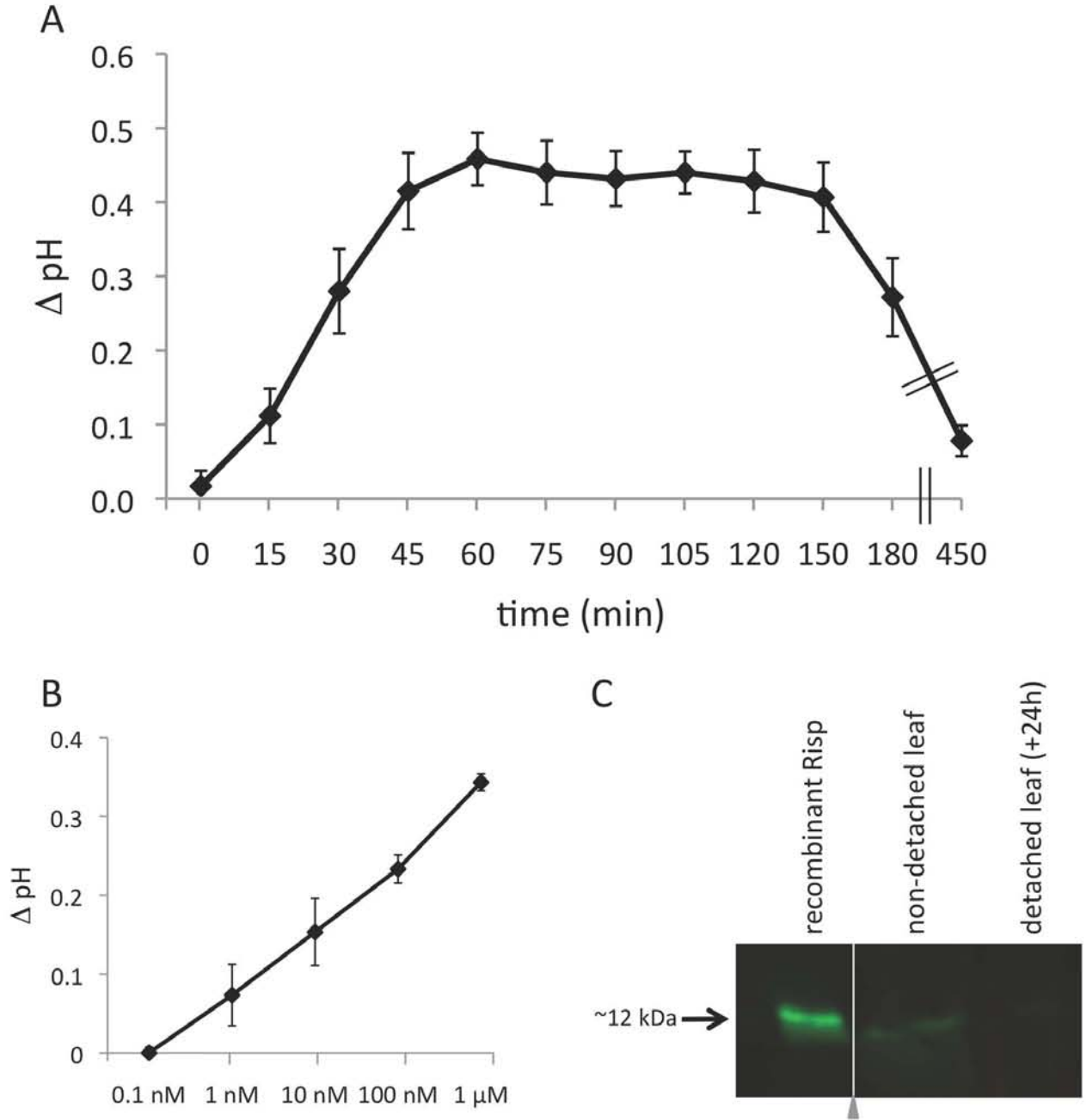
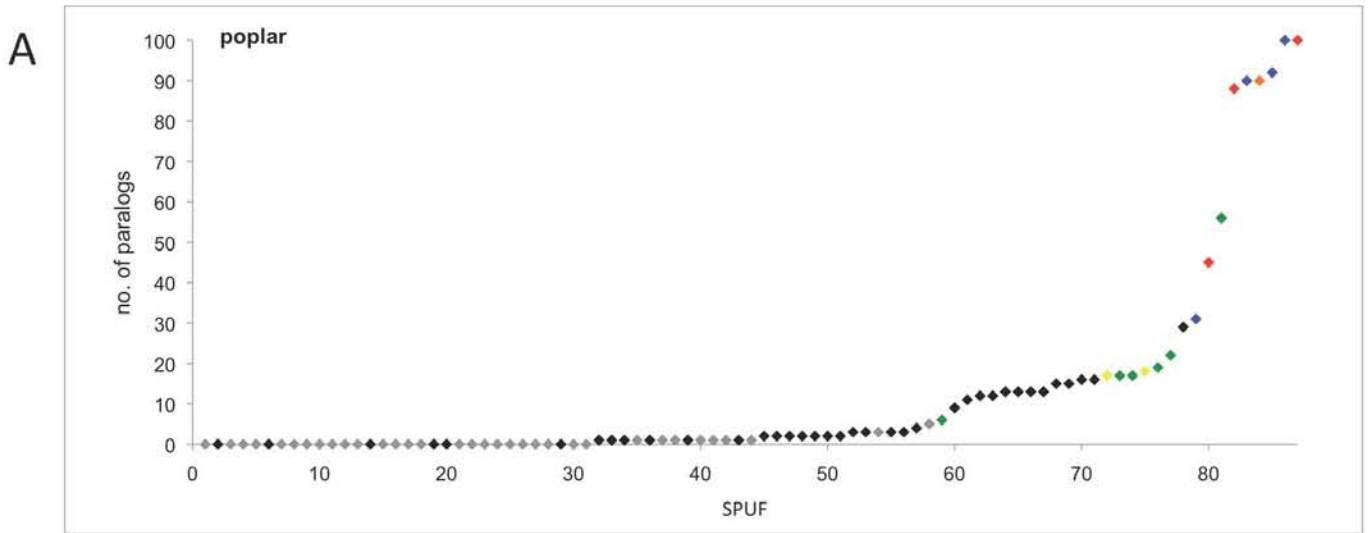


Figure S1



Partial or complete identified domains identified in several poplar SPUF:

◆ NB-ARC

◆ Glycosyltransferase

◆ PLN00113 (LRR RLP)

◆ P-Loop_NTPase

◆ Oligopeptide transporter

◆ No homologs in other plants

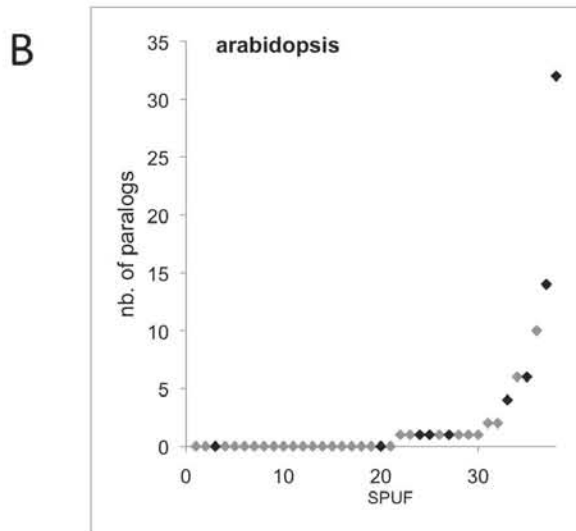


Figure S2

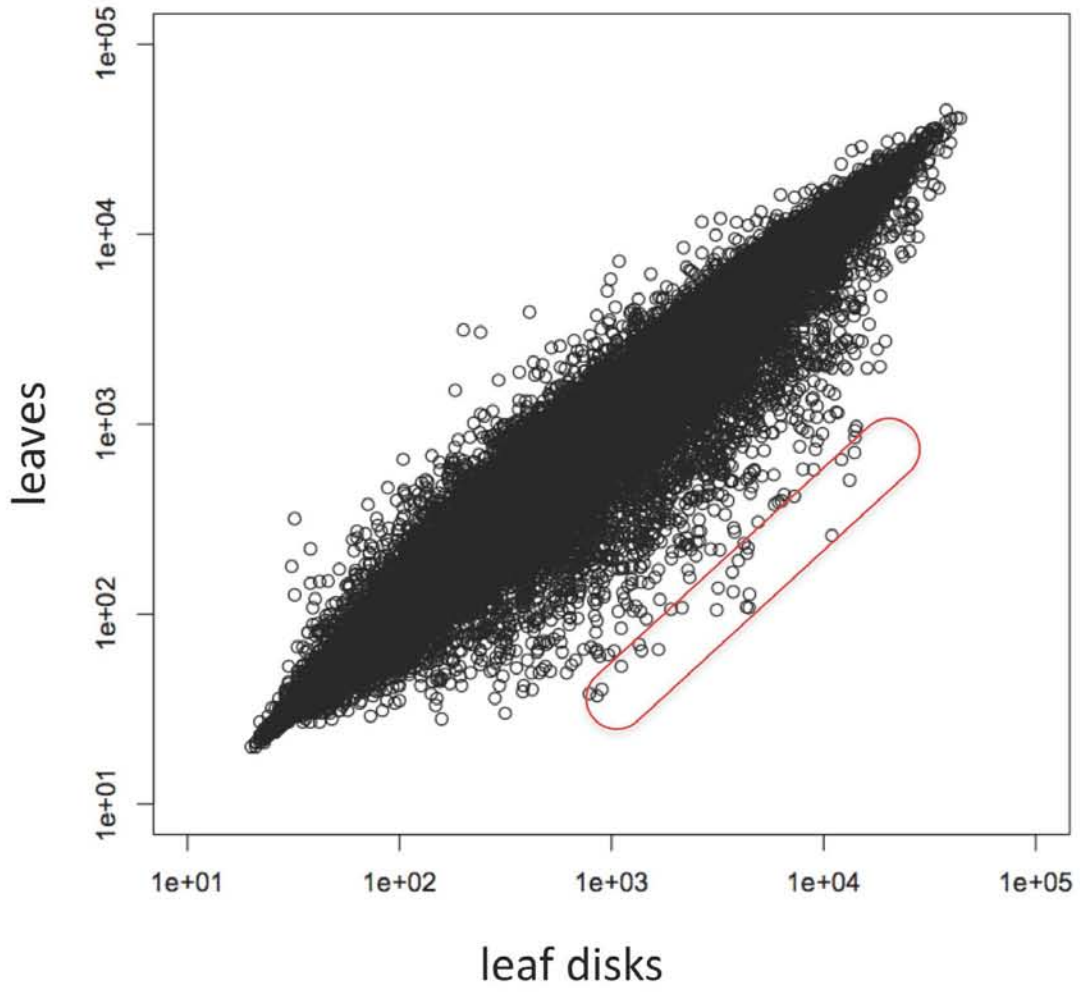


Figure S3

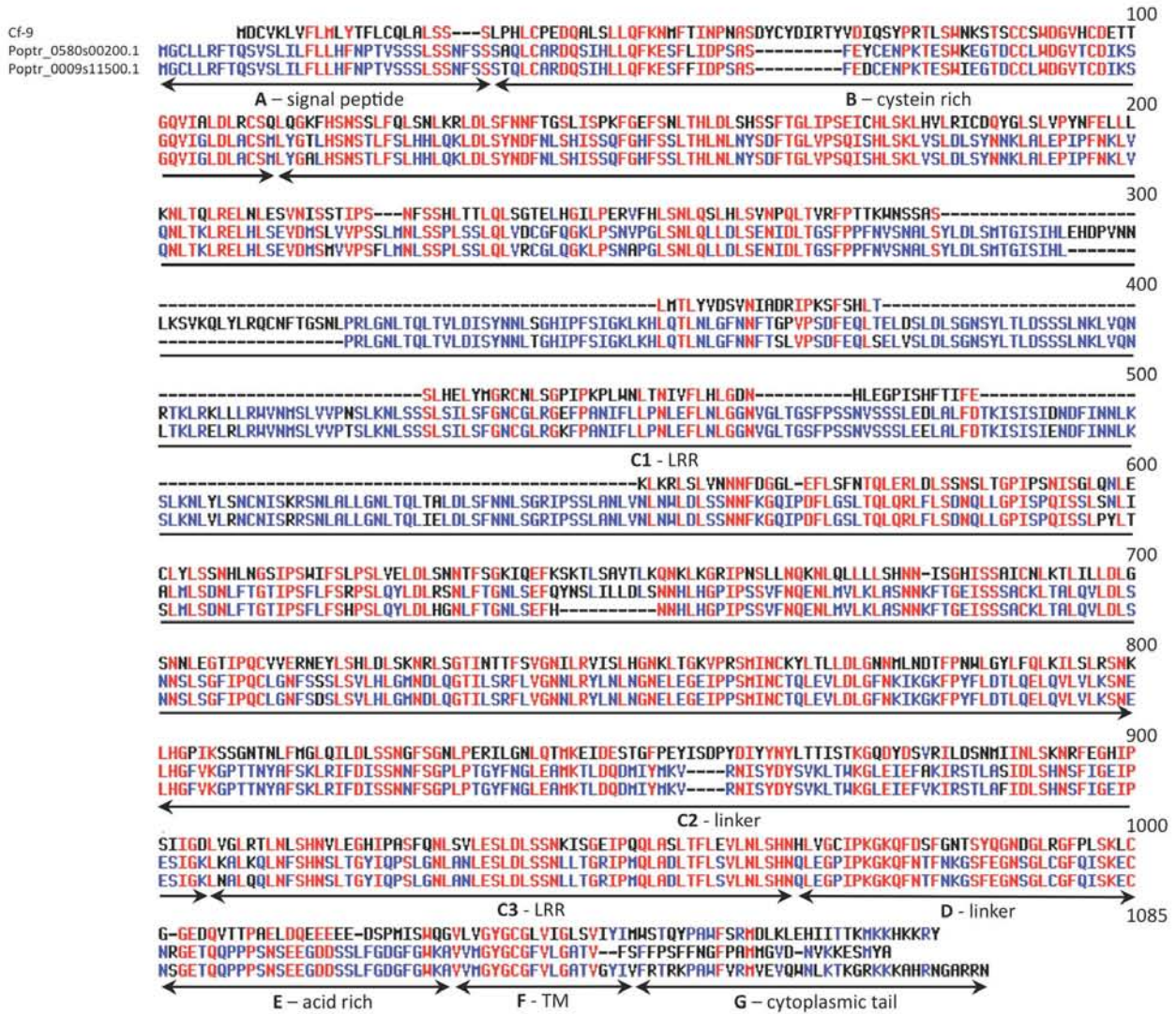
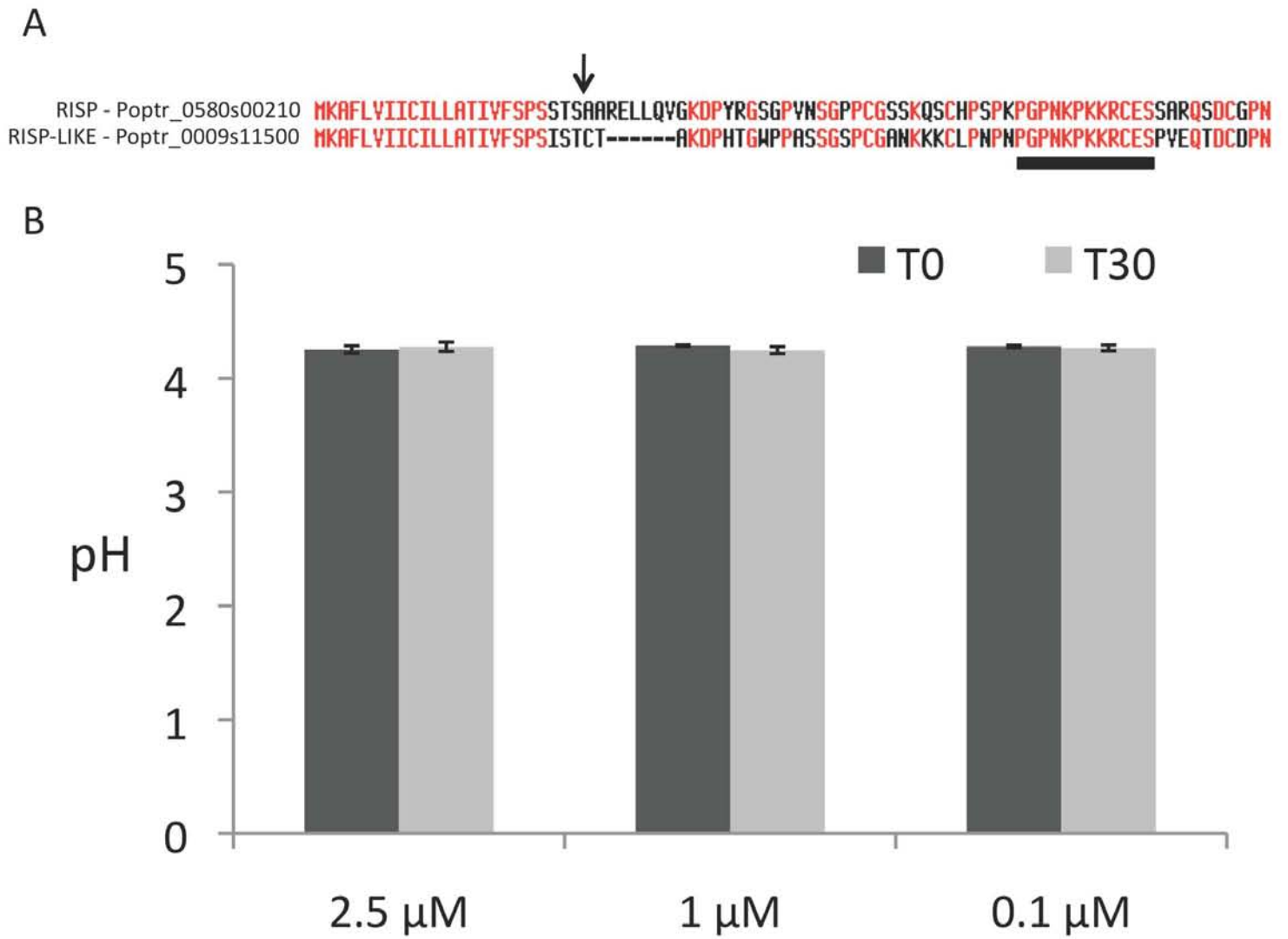


Figure S4



CHAPITRE V : Analyse fonctionnelle de la protéine Risp de peuplier

CHAPITRE V

Analyse fonctionnelle de la protéine Risp de peuplier

Résumé du chapitre V

Analyse fonctionnelle de la protéine Risp de peuplier

Le gène *Risp* (*Rust-induced secreted protein*) est le plus fortement induit lors de la mise en place d'une résistance complète à *M. larici-populina* chez le peuplier. Il est notamment co-régulé avec un grand nombre de protéines antimicrobiennes déjà connues et étudiées chez d'autres plantes modèles. Risp est une petite protéine de 60 acides aminés sous sa forme mature, prédite sécrétée, basique (point isoélectrique de 9,5), riche en cystéines (4) et qui ne possède pas d'homologues dans les bases de données.

Lors de mon stage de master 2 au sein de l'UMR IAM, effectué de février à juin 2009, nous avons émis l'hypothèse que Risp puisse être un nouveau peptide antimicrobien, spécifique au peuplier. Des tests préliminaires avaient alors montré la capacité de la protéine Risp recombinante à inhiber la croissance de *M. larici-populina in vitro* et à la surface des feuilles de peuplier. Au début de ma thèse, nous avons entrepris d'approfondir ces travaux, en montrant notamment que Risp est intrinsèquement désordonnée mais extrêmement stable, et adopte des structures secondaires dans des environnements mimant les conditions membranaires. Elle est également capable de se lier aux spores du champignon. D'autre part, nous avons montré que la protéine Risp recombinante peut activer un composant du système immunitaire végétal, en induisant un décalage du pH vers des valeurs basiques dans des cultures cellulaires végétales, à la manière des éliciteurs peptidiques endogènes (voir également chapitre IV). Nous discutons largement les évidences qui permettraient de considérer Risp comme étant le premier peptide de plante qui présente la dualité fonctionnelle d'activation du système immunitaire végétal et d'action antifongique directe sur un agent pathogène, à la manière des peptides de défense de l'hôte décrits chez les mammifères.

Ce chapitre de thèse comporte un article de recherche rédigé en anglais, intitulé '***A poplar cationic small-secreted protein elicits plant defense responses and directly inhibits pathogen growth***', en préparation pour soumission à la revue 'Plant Physiology' et dont je suis le premier auteur. Comme pour le chapitre IV, les tests d'alcalinisation des cultures cellulaires ont été effectués lors des stages réalisés au sein du laboratoire d'Armand Séguin au Québec, en étroite collaboration avec Hugo Germain.

Article n°5 : A poplar cationic small-secreted protein elicits plant defense responses and directly inhibits pathogen growth.

Benjamin Petre, Arnaud Hecker, Hugo Germain, Meriem Benchabane, Pascale Tsan, Armand Séguin, Sébastien Duplessis, Nicolas Rouhier

Article en préparation pour être soumis à la revue 'Plant Physiology'

Sept fichiers de matériel supplémentaire sont fournis avec cet article :

- six figures supplémentaires sont disposées à la fin de l'article
- une table supplémentaire est disponible en version électronique

A poplar cationic small-secreted protein elicits plant defense responses and directly inhibits pathogen growth

Benjamin Petre¹, Arnaud Hecker¹, Hugo Germain², Meriem Benchabane³, Pascale Tsan⁴, Armand Séguin³, Sébastien Duplessis¹, Nicolas Rouhier¹

¹INRA, UMR 1136 INRA/Université de Lorraine, Interactions Arbres/Microorganismes, Centre INRA de Nancy, F-54280, route d'Amance, Champenoux, France ; ²Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada ; ³Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Center, 1055 du P.E.P.S., P.O. Box 10380, Stn. Sainte-Foy, Québec, Québec, Canada, G1V 4C7 ; ⁴Université de Lorraine, UMR 7036 CNRS/Université de Lorraine, Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, Equipe Biocristallographie, Faculté des Sciences et Technologies, BP 239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Correspondence:

Dr. Sébastien Duplessis

INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

duplessi@nancy.inra.fr ; + 33 3 83 39 40 13

Pr. Nicolas Rouhier

Université de Lorraine, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences BP 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, France

Nicolas.Rouhier@scbiol.uhp-nancy.fr ; ++ 33 3 83 68 42 25

ABSTRACT

Plants have inducible defense mechanisms to respond to infections and prevent parasite colonization. These responses rely notably on two classes of small proteins: i) the antimicrobial peptides (AMP) which have a direct toxic effect against invaders and ii) the endogenous peptide elicitors (EPE), that behave like hormones and elicit plant defense responses. In animals, peptides that combine both properties are referred to as host defense peptides (HDP), but no such example has been clearly reported in plants to date. The poplar-specific Rust-induced secreted protein (Risp) is a small, cysteine-rich and highly cationic protein with no known function. Risp from *Populus trichocarpa* (RispT) was recently suggested to function as an EPE due to its ability to induce poplar cell-culture media alkalisation. Here, we report that an allele from *Populus deltoides* (named RispD) can also activate plant defenses and that both RispT and RispD exert antimicrobial activities against the poplar leaf rust fungus *Melampsora larici-populina* (*Mlp*). Indeed, the recombinant Risp is able to bind *Mlp* spores and inhibit the growth of the fungus *in vitro* and onto poplar leaves, thus preventing emergence of the rust disease symptoms. Besides, recombinant Risp is thermostable and presents an intrinsically disordered state in aqueous conditions. Interestingly, it adopts α -helical secondary structures in membrane-like solvents, as some eukaryote membrane-permeabilizing AMP. Altogether, our findings suggest that Risp is a novel component of the plant immune system, which combines both AMP and EPE properties.

INTRODUCTION

Plants defend themselves against pathogenic microbes with an inducible immune system (Dodds and Rathjen 2010). Upon sensing microbial presence through the recognition of microbial- or damage-associated molecular patterns (M/DAMP) that are respectively microbe- or plant-encoded molecules, the immune system triggers a wide array of defense responses that can ultimately fend off invaders and prevent infections (Boller and Felix 2009). These plant defense mechanisms notably rely on small-secreted cysteine-rich cationic peptides collectively referred to as antimicrobial peptides (AMP) that exert a direct toxic effect on microbes (Marcos *et al.*, 2008). Well-characterized AMP in plants are lipid-transfer proteins (LTP), thionins and defensins, respectively known as pathogenesis-related (PR) proteins PR-12, PR-13 and PR-14, which exert their antimicrobial activities through permeabilization of microbe membranes (van Loon *et al.*, 2006; Sels *et al.*, 2008). According to the PhytAMP database, only 3 other classes of plant AMP are currently known, e.g. cyclotides, snakins and hevein-like proteins (Hammami *et al.*, 2008). At the structural level, plant AMP typically present rigid 3D structures, whereas many AMP in other eukaryotes are intrinsically disordered in aqueous solutions and adopt α -helical secondary structures in membranes or membrane-like solvents (Pelegri *et al.*, 2011; Haney *et al.*, 2009; Zasloff *et al.*, 2002).

In mammals, some multifunctional AMP can modulate host immunity and have been defined as host defense peptides (HDP; Brown and Hancock 2006; Easton *et al.*, 2009). For instance, mammalian defensins can prevent microbial infections exclusively through their effect on host immune system, independently of their direct antimicrobial action (Selsted and Ouellette 2005). In plants, several endogenous peptide elicitors (EPE) of defense responses are modulators of the immune system (Yamaguchi and Huffaker 2011). Upon wounding or pathogen attack, EPE function in the apoplast and activate immune responses through their specific binding to cell-surface receptors (Monaghan and Zipfel, 2012). Currently, five families of plant EPE are distinguished: systemin, hydroxyproline-rich systemin (HypSys), plant peptide elicitor (Pep), inceptin and subPep. All these peptides originate from the cleavage of larger precursors and have a size comprised between 11 to 23 amino acids (Yamaguchi and Huffaker 2011). To date, neither EPE nor their precursors have been shown to function as AMP. So, no functional homologs of mammal HDP are known in plants.

Poplar was the first tree to have its genome sequenced (Tuskan *et al.*, 2006), which paved the way for genome-wide and transcriptome analyses that greatly improved our knowledge of the poplar immune system (Hacquard *et al.*, 2011). Notably, transcript profiling in leaves infected by avirulent strains of *Mlp* indicated that specific poplar defense responses are mounted 48 hours-post inoculation (hpi; Rinaldi *et al.*, 2007; Duplessis *et al.*, 2009). Most up-regulated transcripts at this specific time-point are homologs of well-known defense genes in arabidopsis, except the most induced gene named *Rust-induced secreted protein (Risp)* that has no homolog in any plant. *Risp* gene is isolated on a small unresolved scaffold in poplar genome sequence, and we reported recently that *Risp* gene is likely physically associated with a *receptor-like protein (RLP)* gene in the poplar genome sequence (Petre *et al.*, unpublished). The fact that the recombinant *Risp* induced alkalinisation of poplar suspension-cultured cells and that *Risp* is possibly cleaved in leaves upon stress prompted us to propose that *Risp* is a novel EPE form poplar.

In the present study, we show that *Risp* also presents some AMP activities by inhibiting directly the growth of *Mlp*. We present the biochemical and structural characterization of *Risp*, and discuss potential applications for poplar protection.

RESULTS AND DISCUSSION

***Risp* alleles encode cationic small-secreted proteins whose transcripts accumulate during defense responses**

Two alleles encoding *RispT* (for trichocarpa) and *RispD* (for deltoides) have been recently identified by transcriptome 454 sequencing experiments in Beaupré (*P. trichocarpa* x *P. deltoides* hybrid; Petre *et al.*, 2012). *RispT* and *RispD* are polymorphic (identity of ~80 %) and encode small cationic proteins (79-80 amino acids, predicted pI of 9.5) that possess four cysteines in their C-terminal region (Figure 1A). Both proteins present a similar predicted N-terminal signal peptide of 23 amino acids for secretion in the apoplast. No homolog has been identified in other plants, but interestingly a few unrelated proteins from close plant species possess very close signal peptides (Figure S1). To experimentally validate *Risp* targeting, a full-length (i.e., with the signal peptide) *RispD* fused to GFP was transiently expressed in tobacco leaf cells. A signal that resembles those observed for endoplasmic reticulum (ER) and golgi apparatus (G) markers was retrieved using fluorescence microscopy (Figure 1B). Although further

experiments such as cell plasmolysis and co-localisation by the mean of a confocal microscope are clearly needed, these preliminary results suggest an ER/G localisation that is typical of secreted proteins.

Previous expression analyses indicated that *Risp* transcripts strongly accumulated at 48 hpi, a time-point corresponding to the establishment of poplar defense responses and the arrest of the growth of an avirulent *Mlp* strain (Rinaldi *et al.*, 2007). In order to delineate better *Risp* gene expression profile, *Risp* transcript accumulation was measured by RT-qPCR over a complete infection cycle of poplar leaves by virulent and avirulent strains of *Mlp*, including key time-points such as 12 hpi (penetration through the stomata), 18 hpi (formation of the first haustoria), 48 hpi (arrest of growth of the avirulent strain upon poplar defense responses) and 168 hpi (formation of uredinia by the virulent strain). *Risp* transcripts strongly accumulated between 36 and 72 hpi with the avirulent strain, whereas its transcript levels remained basal along the whole time-course experiment in either uninfected leaves or leaves infected by a virulent strain (Figure 1C). This specific and transient peak of expression is typically observed for poplar defense genes (e.g. thaumatin-like protein, PR-5; Petre *et al.*, 2011). Altogether, *Risp* presents the typical characteristics of plant AMP, e.g ; small, secreted, cationic, cysteine-rich, induced during resistance (Marcos *et al.*, 2008), what led us to suggest that *Risp* could be a new plant AMP involved in defense reactions against *Mlp*.

Recombinant Risp inhibits the growth of Mlp in vitro

We tested the antifungal activity of *Risp* by analyzing the capacity of a purified recombinant untagged *Risp*T as well as N-terminal hexa-histidine tagged (His₆-tagged) *Risp*T (*Risp*T_{ht}) and *Risp*D (*Risp*D_{ht}) to inhibit *Mlp* spore germination *in vitro* (Figure 2A). All recombinant proteins significantly impaired spore germination at a concentration of 10 to 50 μM and almost completely abolished germination at 100 μM (Figure 2B). BSA or other recombinant proteins such as *Arabidopsis thaliana* glutaredoxin C1 (AtGrxC1) and His₆-tagged *A. thaliana* BolA (AtBolA_{ht}) did not prevent spore germination (Figure S2A). Next, to assess whether *Risp* can also affect germ tube elongation, recombinant proteins were added onto spores that germinated for 4 hours and germ tube length was measured after 4 additional hours. Whereas the length of germ tubes reached ~400 μm in all control conditions, it was reduced to ~250-300 μm in the presence of both *Risp*T_{ht} and *Risp*D_{ht}, which corresponds to an inhibition of 50 to 75 % of the elongation (Figure 2C). We also investigated whether *Risp* antifungal

activity could be extended to other microbes by testing the ability of recombinant RispT to inhibit *in vitro* mycelium growth of the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* and both mycelium growth and spore germination of the rice blast ascomycete *Magnaporthe oryzae*. RispT inhibited neither the growth nor the germination of these fungi (Figures S2B-D). Finally, recombinant Risp did not affect the growth of the bacteria *E. coli* and *Pseudomonas syringae* in liquid media (data not shown).

Risp functions at concentrations within the range of other plant AMP that inhibit spore germination of rust fungi, with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of ~30 μM (Vasconcelos *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2010). The fact that Risp is only found in poplar and that it exclusively exhibits an antifungal activity against *Mlp* is likely due to the co-evolution that occurs between AMP and their targets as previously observed (Peschel and Sahl 2006). We concluded that Risp constitutes a novel class of plant AMP that likely accumulates in poplar tissues to inhibit *Mlp* growth.

Risp is likely cleaved in poplar leaves and RispD_{ht} alkalinises cell cultures

AMP are usually highly abundant in soluble protein extracts from plant tissues, especially upon pathogen infection, which facilitate their detection by proteomic approaches such as 2-D SDS-PAGE or western blot (Ekramoddoullah *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). We examined Risp protein abundance by western blot over selected points of the time-course infection, using the plant materials used for transcript expression measurement. Risp was only detected in soluble protein fractions at 4 time-points: at the T₀ of the time course, in the mock-inoculated condition at 168 hpi and during the late compatible interaction (C₉₆ and C₁₆₈) when the fungus has completely invaded the leaves (Figure 3B; Figure S3). Strikingly, Risp transcript levels remained stable and low at these four time-points (Figure 1B). In contrast, Risp was not detected during the incompatible interaction, even at I₄₈ when the peak of transcript accumulation occurred. All attempts to identify Risp during the incompatible interaction between 48 and 96 hpi by performing new infections, by extracting total proteins as well as thermosoluble proteins, by adding protease inhibitors cocktails or by using immunoprecipitation failed (Table S1A; data not shown). The presence of Risp during the successful infection and its absence during defense responses are not consistent with an effective participation of Risp to immunity as an efficient AMP. Many plant proteases are inhibited by fungal invasion, what could possibly prevent the processing of precursors of EPE and thus the release of bioactive peptides activating defense responses (van der

Linde *et al.*, 2012). Considering Risp as a potential precursor of an EPE, such mechanism could explain the accumulation of the protein during the late compatible interaction and its absence during strong defense responses.

Altogether, these results point to a possible degradation or cleavage of Risp in leaves, which would be in agreement with its observed EPE function. Indeed, we reported recently that Risp_{Tht} was able to elicit the alkalisation of poplar cell suspensions (Petre *et al.*, unpublished). Under similar experimental conditions, a comparable effect was obtained with Risp_{Dht}, which triggered a transient increase of pH reaching a maximum of 0.4 units after 45 minutes (Figure 3A). Assays were conducted with 1 μ M of Risp_{Dht} in order to fit to the experimental conditions described in our precedent report, where Risp_{Tht} was independently shown to elicit a shift of pH in culture media at 10 nM (Petre *et al.*, unpublished). These concentrations remain in the upper range of EPE effective concentrations usually reported in literature, but it is possible that entire Risp would be only a precursor of fully bioactive peptide(s) that remains to be identified. To conclude, these results suggest that Risp can activate a component of the plant immune system and is likely subjected to cleavage in leaves in a stress perception- and fungal infection-dependent manner, which are typical properties of EPE.

Recombinant Risp is thermostable, intrinsically disordered and binds to Mlp spores in vitro

In order to get insights into Risp AMP function, the biochemical and structural characterisation of recombinant Risp was initiated. By using solution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and circular dichroism (CD), we revealed that recombinant Risp is in an intrinsically disordered state in aqueous solution (Figure 4A; Table S1B), which means that it presents flexible and variable conformations instead of a fixed 3D structure (Chouard *et al.*, 2011, Uverski 2011). Interestingly, whereas some commonly used membrane-mimetic solvents (sodiumdodecyl sulfate [SDS] micelles, methanol/chloroform mixture, trifluoroethanol [TFE]) had very limited folding effect as estimated by NMR spectroscopy experiments, CD spectra achieved in the presence of 80% TFE revealed that Risp_{Tht} was partially folded, possessing up to 34 % of predicted α -helices (Figure 4A; Table S1C). Owing to the presence of four cysteine residues, we wondered whether unfolded state could be attributed either to abnormal cysteine oxidation or, on the opposite, to the absence of correct disulfide bridges as *E. coli* cytoplasm has a reducing environment. The titration of free thiol groups under

denaturing conditions for the untreated purified Rispt gave an averaged value of 0.01 ± 0.02 , whereas a value of 3.57 ± 0.35 free thiol groups per protein was obtained for a reduced Rispt. Since a single peak corresponding to the mass of a Rispt monomer was obtained by mass spectrometry analyses (**data not shown**), we concluded that recombinant Rispt was purified with two intramolecular disulfide bridges. Besides, the reduction of Rispt has a negligible effect on the CD spectrum of the protein, which indicates that the intrinsically disordered state of Rispt is independent of the redox status of cysteine residues (**Figure S4A**; **Table S1B**). The unfolded nature of the protein prompted us to investigate its thermostability, a property classically associated with this kind of conformation (**Nishie et al., 2012**). After 10 min incubation at 95°C, oxidized or reduced recombinant Rispt remained soluble and conserved their ability to inhibit spore germination *in vitro* (**Figure 4B**). Overall, these results indicate that Rispt is thermostable and do not resemble other plant AMP that are usually structured (**Pelegri et al., 2011**), but rather have properties similar to most eukaryote, non-plant AMPs and prokaryotic bacteriocins, e.g., thermostability, intrinsically disordered state in aqueous solutions and adoption of α -helices in membrane-like solvents (**Haney et al., 2009**). These AMP generally function by perturbing microbial membranes, what lead to cell lysis and death (**Marcos et al., 2008**). We were not able to identify protein partners of Rispt in soluble proteins isolated from *Mlp*-infected leaves (**Table S1A**), which prompted us to hypothesize that Rispt could function as an AMP by interacting with *Mlp* membranes. Consistently, the abundance of basic (i.e., positively charged) residues is known to enhance the ability to interact with negatively charged microbial membranes (**Zasloff 2002**).

Recombinant Rispt attach to Mlp spores in vitro

To inhibit microbial growth, AMP often require a direct interaction with the microbes. In order to estimate the ability of recombinant Rispt to attach to *Mlp* spores *in vitro*, a pull-down assay was developed, by mixing *Mlp* urediniospores and recombinant RISP, either in their mature forms or fused to GFP for fluorescence visualisation. Both Rispt_{ht} and Rispt_{Dht} strongly attached to spores *in vitro*, whereas Rispt-GFP_{ht} and Rispt_{Dht}-GFP_{ht} fusions, recombinant GFP and several other small recombinant proteins did not (**Figure 5**; **data not shown**). Accordingly, no specific GFP signal on *Mlp* spores incubated with recombinant Rispt-GFP fusions was observed by fluorescence microscopy (**Figure S5**). The next step will be to solve its 3D structure when directly attached to *Mlp* spores by

using solid-state NMR spectroscopy, a method widely chosen to get insight into 3D structures of AMP interacting with their targets (Bechinger and Salnikov 2012).

Recombinant Risp inhibits rust disease on poplar leaves

Considering the antifungal properties of Risp against *Mlp* *in vitro*, we tested whether Risp anti-germinative effect could function directly on the surface of poplar leaves to control rust disease. When RispT and *Mlp* spores were simultaneously applied by pulverisation or by pipeting on Beaupré leaves, RispT strongly inhibited the level of disease symptoms as indicated by the reduced number of uredinia visible after 7 days on the leaf surface (Figure 6A-B). Besides, RispT was deposited on selected leaf areas and then the whole leaf was inoculated with *Mlp* urediniospores. In this experiment, Risp-treated zones remained free of uredinia up to 3 weeks after inoculation (Figure 6C). Full-prevention of rust disease symptoms also operated when rust inoculation was performed 3 or 5 days after Risp local deposition, indicating that the recombinant protein can remain functional for days on the leaf surface (Figure S4).

Epidemics of *Mlp* lead to considerable damages in plantations and the perennial status of poplar impaired attempts of sustainable breeding with qualitative resistances (Duplessis *et al.*, 2009). The ability of Risp to inhibit rust disease when applied exogenously onto poplar leaf surface could be used as a bio-control strategy. Indeed, methods for producing massive amount of recombinant proteins in *E. coli* are available (Bommarius *et al.*, 2010). Risp is thermostable, which could be an advantageous property for cost-effective purification of recombinant Risp of high purity, since almost all *E. coli* proteins precipitate upon heating. Moreover, we showed that recombinant Risp is stable for days on the surface of poplar leaves, demonstrating that the protein could be robust enough to be pulverised in the field and might represent valuable alternative to the currently used fungicides.

CONCLUDING REMARK

In this study, we report the analysis of Risp, a cationic small-secreted protein only found in poplar. We show that recombinant Risp is intrinsically disordered and exerts antifungal activities against *Mlp* *in vitro* and onto poplar leaves. Furthermore, in accordance with a precedent study, we show that Risp could also elicit poplar defense responses. Thus, similarly to HDP in mammals, Risp functions both as an antimicrobial

and as an immunomodulatory agent, what constitute the first biochemical demonstration of an HDP functional homolog in plants.

Interestingly, some authors recently reported genetic evidence that some well-known AMP such as *Capsicum annuum* antimicrobial protein 1 (CaAMP1) or the PR5-1 from *Prunus domestica* (PdPR5-1) can stimulate defense responses when ectopically over-expressed in arabidopsis (Lee *et al.*, 2011; El-kereamy *et al.*, 2011). Hence, these proteins could function as HDP, albeit direct biochemical evidence is needed to validate these genetic approaches. By being able to kill parasites and stimulate immune responses at the same time, HDP are anticipated as promising tools for anti-infective therapeutic and clinical applications (Yeung *et al.*, 2011; Guani-Guerra *et al.*, 2010). Discovery of functional homologs of HDP in plants open similar perspectives for crop protection. For instance, phosphite (H_3PO_3) has been used for decades for crop protection and was recently shown to have both antimicrobial and immunomodulatory properties (Massoud *et al.*, 2012).

MATERIAL AND METHODS

Biological material, growth conditions and inoculation procedures

Hybrid poplars (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*, cultivar 'Beaupré') were cultivated in greenhouse as previously detailed (Rinaldi *et al.*, 2007). *Mlp* isolates 98AG31 (pathotype 3-4-7) and 93ID6 (pathotype 3-4), respectively virulent and avirulent on 'Beaupré', were used in this study. Urediniospore multiplication, conservation and poplar leaf inoculation procedures were carried out as previously described (Rinaldi *et al.*, 2007). *L. bicolor* strain S238N was maintained at 25°C in dark conditions on Pachlewsky P5 medium, with transfer to fresh media every 4 weeks. *M. oryzae* strain Guy11 was maintained at 25°C in dark conditions on complete medium, with transfer to fresh media every 2 weeks. For longer storage, mycelium fragments were conserved on sterile whatman paper at -20°C. For spore production, a frozen-stock was inoculated on complete medium. Spores were retrieved after 12 days by raking the mycelium in sterile water and purified by filtration on sterile Joseph paper, rinsed twice in 50 ml sterile water and immediately used.

Sequence analyses and bioinformatic procedures

Poplar sequences were retrieved from the *P. trichocarpa* 'Nisqually-1' genome sequence hosted on the Phytozome portal (version 2.2, <http://www.phytozome.net/poplar>).

Sequence alignments were performed using the online softwares Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>) or ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Phylogenetic analyses were done on the Phylogeny website (<http://www.phylogeny.fr/>) with default parameters and trees were visualized with Fig tree v1.2.3 as described previously (Petre *et al.*, unpublished). Intrinsically disordered regions were predicted using Globplot online software (<http://globplot.embl.de>). Protein signal peptides were predicted on the SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) and protein parameters were calculated with Protparam program (<http://web.expasy.org/protparam/>).

RNA isolation and RT-qPCR analyses

Time-course infection of poplar leaves by either virulent or avirulent strains of *Mlp* as well as water-agar (mock-inoculated treatment), RNA isolation and cDNA synthesis were performed previously (Petre *et al.*, 2011). Specific primers for RT-qPCR amplification of both RispT and RispD transcripts (*Risp* gene Phytozome ID POPTR_0580s00210.1) were designed and RT-qPCR experiments were carried out as previously described (Table S1D; Hacquard *et al.* 2010). Transcript expression was normalised to a reference ubiquitin transcript previously reported (Rinaldi *et al.* 2007).

Cloning, expression and purification of recombinant proteins

Open reading frame (ORF) sequence encoding mature RispT was available from a precedent study (Petre *et al.*, unpublished) whereas mature RispD ORF was ordered as a synthetic gene (Genecust). Sequences were cloned by PCR into pET15b and/or pET3d plasmids. Primers, plasmid construction and corresponding expressed proteins are presented in Table S1E. Hexa-histidine (His₆)-tagged or untagged recombinant proteins were produced and purified as previously described (Petre *et al.*, unpublished; Couturier *et al.*, 2011) and finally dialysed against 30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (TE) pH 8.0 buffer. In addition, recombinant Risp were incubated 10 min at 95°C to remove residual *E. coli* contaminants that precipitated upon heating. Recombinant AtBolA1 and AtGrxC1 have been produced and purified as in (Feng *et al.*, 2006). For ¹⁵N-labeled RispT production, bacteria were grown in M9 minimal synthetic medium containing ¹⁵NH₄Cl (1 g/L) as previously described (Bouillac *et al.*, 2004). After purification, proteins were dialyzed into a 50 mM phosphate pH 6.0 buffer for NMR analyses.

In vitro antifungal assays

To assess the ability of recombinant proteins to inhibit the germination of *Mlp* urediniospores, almost 15,000 urediniospores (strain 98AG31) were resuspended in 1ml of sterile water under vigorous agitation for 1h, then put in contact with solution of proteins or controls and immediately spread on water-agar (20 g/L) in petri dishes. After 5 h in culture room (constant light 25 $\mu\text{mol/s/m}^2$, 21°C), spores were observed under binocular magnifying glasses (10 to 40 X) and percentage of germination were calculated on a minimum of 300 spores for each repeat. Similarly, to assess the ability of recombinant proteins to inhibit the elongation of the *Mlp* germ tubes, urediniospores were spread alone on water-agar and allowed to germinate in the culture room for 4 h. Then, solutions of proteins or controls were very gently deposited on agar surface to avoid germ tube breaking and petri dishes were maintained in culture room for 4 more hours. Pictures were taken after 4 and 8 h under binocular (4-10 X) and germinating tube length was measured with AnalysisB software (Cell). To assess the ability of recombinant proteins to inhibit the mycelium growth of *L. bicolor* and *M. oryzae in vitro*, drops of 10 μL of 100 μM recombinant Risp or control solutions were placed at the extremities of growing mycelium on paper disks or directly on the medium and growth was recorded after 3 and 7 days for *M. oryzae* and *L. bicolor*, respectively. Phenotype of the hyphae was estimated by light microscopy (40 X). In a different manner, 2 mm^3 implants were transferred on appropriate fresh media and 100 μL of 100 μM recombinant Risp or control solutions were directly deposited on the implant in order to cover it completely. Growth of the fungi was recorded after 8 days. To assess the ability of recombinant proteins to inhibit the germination of *M. oryzae* spores, the latter were allowed to germinate in glass cupules with 100 μM recombinant Risp or control solutions. Germination was recorded after 6h and 24h under a light microscope (10 X).

Antifungal assay on poplar leaves

Beaupré leaves were inoculated with a mix of *Mlp* (strain 98AG31, virulent on Beaupré) urediniospores (100,000 spores/ml) and recombinant proteins, TE pH 8.0 buffer or double-distilled water (ddH₂O). Inoculation was performed on entire leaves as previously described (Rinaldi *et al.*, 2007) or with a pipet on 5 cm^2 leaf disks. Pictures were taken 7 to 10 days-post inoculation (dpi). For pre-treatments by recombinant Risp prior to inoculation, 1 ml of recombinant proteins or controls were deposited with a pipet on 3 cm^2 areas of 3 different Beaupré leaves and then inoculated with *Mlp*

urediniospores (100,000 spores/ml, strain 98AG31) immediately, three or five days later. Appearance of uredinia was followed from 8 to up to 20 dpi.

Recombinant protein reduction and thiol titration

Recombinant proteins were reduced with a 100-fold excess of DTT (usually 10 mM for 100 μ M recombinant proteins) for 1 h at room temperature, as previously reported (Rouhier *et al.*, 2004). Proteins were then precipitated with 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 30 min, centrifuged 10 min at 10,000 x g and the pellet was washed twice with 1% (w/v) TCA. The pellet was then resuspended in TE buffer with 1% SDS (w/v). Alternatively, DTT was removed by desalting on G25 columns (GE Healthcare). In both cases, protein concentration was quantified by spectrophotometry using a molar extinction coefficient of 1,640 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 280 nm. For thiol titration, 20 μ M of native and pre-reduced recombinant proteins were incubated with 100 μ M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) for 1 h in the dark. Absorbance was measured at 412 nm and free-thiol content was calculated using a TNB- molar extinction coefficient of 13,600 $M^{-1}.cm^{-1}$ as previously reported (Rouhier *et al.*, 2004).

Structural analyses

For CD analyses, Rispt_{ht} recombinant proteins were adjusted to 50 to 200 μ M in a 10 mM phosphate buffer pH 7.0. CD spectra were recorded on a Jobin-Yvon CD6 spectropolarimeter in triplicates at 20°C with 0.2 nm wavelength increments from 190 to 250 nm, using a 0.1 mm path length cuvette. The spectra were corrected from the buffer baseline. CD spectra of the reduced protein were performed with 10 mM DTT added 10 min prior to analyses. For experiments with TFE, 50 or 80% TFE was added to recombinant proteins 1h prior to analyses. Secondary structure abundance predictions were performed with Selcon3 and ContinII softwares. ¹⁵N-labelled Rispt was used for NMR analyses. Alternatively, unlabelled Rispt_{ht} was analyzed after incubation with ¹⁵N-labelled TFE (Eurisotop), SDS or a membrane-mimetic mixture composed of methanol-chloroform-water (4:4:1; Table S1B).

Protein isolation and Western blot

Proteins were isolated from similar tissues to those used to perform precedent transcriptional expression experiments (Petre *et al.*, 2011). Frozen leaf disks of 100 mg were ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen, and soluble and insoluble proteins were isolated as previously described with or without a cocktail of enzyme inhibitors (Fermentas; Rouhier *et al.*, 2004). Alternatively, a protein extract enriched in

thermosoluble proteins was obtained by boiling soluble proteins. Protein extracts were finally quantified, adjusted at 2 µg/µL in Laemmli buffer, denatured and stored as previously described (Petre *et al.*, unpublished). All protein extracts were separated on 15% SDS-PAGE to estimate protein concentration and integrity. Western blot experiments were performed in the same conditions as precedently described (Petre *et al.*, unpublished), with the same anti-Risp purified antibodies and pre-immune and depleted sera as controls.

In vitro immuno-precipitation and pull-down

Soluble proteins extracted from Beaupré leaves infected by *Mlp* (strain 93ID6, avirulent on Beaupré) 96 hpi were used for the immuno-precipitation assay with the direct IP kit (Pierce), following manufacturer instructions. Alternatively, soluble proteins extracted from Beaupré leaves infected by *Mlp* (strain 98AG31, virulent on Beaupré) 65 hpi were used for a pull-down assay as previously described (Petre *et al.*, unpublished), with Risp^{T_{ht}} used as bait. Retrieved proteins were subjected to tryptic digestion and peptides were analysed with by mass spectrometry (nano LC-MS/MS) as previously described (Bäckström *et al.*, 2007).

Poplar cell suspension alkalization assay

Poplar cell suspensions (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*, hybrid H11-11) were used for alkalisation assays performed as described previously (Petre *et al.*, unpublished).

Pull-down of Risp with Mlp spores

Mlp urediniospores, strain 98AG31, were resuspended in sterile ddHOH with tween 20 0.05 % under vigorous agitation for 30 minutes. Five hundred micrograms of resuspended spores were incubated with 50 µg of recombinant proteins for 5 minutes under gentle agitation in ddHOH. Spores were washed twice with 1 ml of ddHOH by centrifugation at 13,000 g for 30 s. Finally, spores were incubated in 100 µL of Laemmli buffer, incubated 10 min at 95°C and centrifuged again (the supernatant being considered as the final elution). Presence of recombinant proteins in the different fractions was estimated by 15 % SDS-PAGE.

Transient expression of GFP-fusions in Nicotiana benthamiana

ORF coding for full-length RispD and RispT (i.e. with the signal peptide) were amplified from Beaupré leaf cDNA and cloned in frame with the N-terminus of GFPS65C into pCK vectors (see Table S1E for details). Organelle markers used were reported previously (Nelson *et al.*, 2007). *Nicotiana benthamiana* fully developed young-leaf cells were

transfected with tungsten particles coated with recombinant plasmids by the mean of the PDS/1000-He particle delivery system (Bio-Rad) under a pressure of 1100 psi. After bombardment, plant material was maintained on MS medium in petri dishes under dark conditions at room temperature. Images were retrieved on an AxioLab A1 (Zeiss) epifluorescence microscope (excitation at 450 nm, filtered wavelength superior to 480 nm) ~16 hours post-bombardment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors warmly thank Claire Veneault-Fourrey (INRA Nancy, France) for her help with *M. oryzae* spore isolation, Gervais Pelletier (NRC, Canada) for his help with poplar cell suspension cultures, Pascal Frey and Bénédicte Fabre (INRA Nancy) for their advices on poplar culture in greenhouses and *Mlp* inoculations as well as for providing rust fungus material, Patrice Vion and Christine Delaruelle (INRA Nancy) for technical help, Stéphane Hacquard (INRA Nancy) for helpful discussions about RT-qPCR, Tiphaine Lamant (Université de Lorraine, Nancy) for some bacterial cultures, Edgar Meux (Université de Lorraine, Nancy) for providing plasmids, Alexandre Kriznik (Université de Lorraine, Nancy) for its help with circular dichroism, Gunnar Wingsle and Vaibhav Srivastava (UPSC, Sweden) for mass spectrometry analyses.

LITERATURE CITED

- Bäckström S, Elfving N, Nilsson R, Wingsle G, Björklund S** (2007) Purification of a Plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* Identifies PFT1 as the Med25 Subunit. *Mol Cell* **26**: 717-729
- Bechinger B, Salnikov ES** (2012) The membrane interactions of antimicrobial peptides revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Chem Phys Lipids* **165**: 282-301
- Boller T, Felix G** (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379-406
- Bommarius B, Jenssen H, Elliot M, Kindrachuk J, Pasupuleti M, Gieren H, Jaeger K-E, Hancock REW, Kalman D** (2010) Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides* **31**: 1957-1965

- Bouillac S, Rouhier N, Tsan P, Jacquot J-P, Lancelin J-M** (2004) Letter to the Editor: ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR assignment of the homodimeric poplar phloem type II peroxiredoxin. *J Biomol NMR* **30**: 105-106
- Brown KL, Hancock REW** (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* **18**: 24-30
- Chouard T** (2011) Breaking the protein rules. *Nature* **471**: 151-153
- Couturier J, Ströher E, Albetel A-L, Roret T, Muthuramalingam M, Tarrago L, Seidel T, Tsan P, Jacquot J-P, Johnson MK, Dietz K-J, Didierjean C, Rouhier N** (2011) *Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins. *J Biol Chem* **286**: 27515-27527
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539-548
- Duplessis S, Major I, Martin F, Séguin A** (2009) Poplar and Pathogen Interactions: Insights from *Populus* Genome-Wide Analyses of Resistance and Defense Gene Families and Gene Expression Profiling. *Crit Rev Plant Sci* **28**: 309-334
- Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock REW** (2009) Potential of immunomodulatory host-defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol* **27**:582-590
- Ekramoddoullah AKM, Davidson JJ, Taylor DW** (1998) A protein associated with frost hardiness of western white pine is up-regulated by infection in the white pine blister rust pathosystem. *Can J For Res* **28**: 412-417
- El-kereamy A, El-sharkawy I, Ramamoorthy R, Taheri A, Errampalli D, Kumar P, Jayasankar S** (2011) *Prunus domestica* Pathogenesis-Related Protein-5 Activates the Defense Responses Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection. *Plos ONE* **6**: e17973
- Fang ZD, Marois JJ, Stacey G, Schoelz JE, English JT, Schmidt FJ** (2010) Combinatorially Selected Peptides for Protection of Soybean Against *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* **100**: 1111-1117
- Feng Y, Zhong N, Rouhier N, Hase T, Kusunoki M, Jacquot J-P, Jin C, Xia B** (2006) *Biochemistry* **45**: 7998-8008

- Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terá LM** (2010) Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* **135**:1-11
- Hacquard S, Petre B, Frey P, Hecker A, Rouhier N, Duplessis S** (2011) The Poplar-Poplar Rust Interaction: Insights from Genomics and Transcriptomics. *J Pathog* doi:10.4061/2011/716041
- Hacquard S, Veneault-Fourrey C, Delaruelle C, Frey P, Martin F, Duplessis S** (2010) Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for *in planta* RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* **75**:106-112
- Hammami R, Ben Hamida J, Vergoten G, Fliss I** (2008) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucl Acid Res* **37**: 963-968
- Hancock REW, Sahl H-G** (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat biotechnol* **12**: 1551-1557
- Haney EF, Hunter HN, Matsusaki K, Vogel HJ** (2009) Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? *Bioch Biophys Acta* **1788**: 1639-1655
- Lee SC, Hwang IS, Hwang BK** (2011) Overexpression of the pepper antimicrobial protein CaAMP1 regulates the oxidative stress- and disease-related proteome in *Arabidopsis*. *Planta* **234**: 1111-1125
- Liu J-J, Zamani A, Ekramoddoullah AKM** (2010) Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine. *Planta* **231**:637-651
- Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López-García B** (2008) Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 273-301
- Massoud K, Barchietto T, Le Rudulier T, Pallandre L, Didierlaurent L, Garmier M, Ambart-Bretteville F, Seng J-M, Saindrenan P** (2012) Dissecting Phosphite-induced Priming in *Arabidopsis* Infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiol* **159**: 286-298
- Monaghan J, Zipfel C** (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 1-9
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A** (2007) A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J* **51**: 1126-1136

- Nishie M, Nagao J-I, Sonomoto K** (2012) Antibacterial Peptides 'Bacteriocins': An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications. *Biocontrol Science* **17**:1-16
- Pelegri PB, del Sarto RP, Silva ON, Franco OL, Grossi-de-Sa MF** (2011) Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. *Biochem Res Int* doi:10.1155/2011/250349
- Peschel A, Sahl H-G** (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 529-536
- Petre B, Morin E, Tisserant E, Hacquard S, Da Silva C, Poulain J, Delaruelle C, Rouhier N, Martin F, Kohler A, Duplessis S** (2012) RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers *PtSultr3;5*, a fungal-induced host sulfate transporter. *PLoS ONE* **8**: e44408
- Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S** (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biol* **11**: 33
- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F, Duplessis S** (2007) Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiol* **144**:347-366
- Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto J, Jordy M-N, de Fäy E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire S, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot J-P** (2004) Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense. *Plant Physiol* **134**: 1-12
- Sels J, Mathys J, de Coninck BMA, Cammue BPA, de Bolle MFC** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides
- Selsted ME, Ouellette AJ** (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* **6**: 551-557
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A *et al.*** (2006) The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1593-1604
- Uversky VN** (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. **43**: 1090-1103
- Van der Linde K, Hemetsberger C, Kastner C, Kaschani F, van der Hoorn RAL, Kumlehn J, Doehlemann G** (2012) A Maize Cystatin Suppresses Host Immunity by Inhibiting Apoplastic Cysteine Proteases. **24**: 1295-1300

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 135-162
- Vasconcelos EAR, Santana CG, Godoy GV, Seixas CDS, Silva MS, Moreira LRS, Oliveira-Neto OB, Price D, Fitches E, Filho EXF, Mehta A, Gatehouse JA, Gross-De-Sa MF** (2011) A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination. **11**:14
- Wang X, Tang C, Deng L, Cai G, Liu X, Liu B, Han Q, Buchenauer H, Wei G, Han D, Huang L, Kang Z** (2010) Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiol Plant* **139**: 27-38
- Yamaguchi Y, Huffaker A** (2011) Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 1-7
- Yeung ATY, Gellatly SL, Hancock REW** (2011) Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci* **13**: 2161-2176
- Zaslloff M** (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Risp alleles encode polymorphic small-secreted proteins whose transcripts transiently accumulate during poplar defense responses.

(A) Sequence alignment of Risp alleles identified in Beaupré (*Populus trichocarpa* X *Populus deltoides* hybrid). RispT: proposed *P. trichocarpa* allele, RispD: proposed *P. deltoides* allele. The predicted signal peptide for secretion is delimited by arrows, the 4 conserved cysteines are shaded, grey and black asterisks indicate synonymous and non-synonymous substitutions respectively. The predicted intrinsically disordered region and the small predicted α -helix are indicated with dotted and triple lines respectively.

(B) Transient expression of GFP-fusions in tobacco leaf cells. RispD-GFP with its signal peptide as well as markers of endoplasmic reticulum (ER) and Golgi (G) apparatus were transiently expressed in *N. benthamiana* leaf cells transfected by biolistic. Leaves were observed after ~18h by epifluorescence microscopy (magnification 10-40x, laser: 450 nm, filter: ≤ 480 nm).

(C) RT-qPCR expression profile of Risp transcripts during a time-course infection of 'Beaupré' leaves with either virulent (compatible interaction) or avirulent (incompatible interaction) strains of *Mlp*. Mock-inoculated leaves were used as

a control treatment and transcript expression was normalized to a poplar ubiquitin transcript. Error bar: SD, n=2.

Figure 2. Recombinant Risp inhibit *Mlp* growth *in vitro*. (A) Pictures of *Mlp* urediniospores *in vitro*. Urediniospores were plated on water-agar in petri dishes with a TE buffer (a-b) or RISP-T_{ht} (c-d) and pictures were taken 5h later under a binocular or a light microscope (magnification 5-20x). (B) Recombinant Risp inhibit urediniospore germination. Urediniospores mixed with recombinant Risp, TE pH 8.0 of ddHOH were plated on water-agar in petri dishes. After 4.5 h, a minimum of 300 urediniospores was observed and considered to calculate a percentage of germination. Protein concentration in μM is indicated. Error bar: SE, n \geq 2. (C) Recombinant Risp inhibit germ tube elongation. Urediniospores germinated for 4 h on water-agar in petri dishes, then recombinant Risp, TE pH 8.0, ddHOH or recombinant AtGrxC1 were carefully deposited onto the medium and incubated 4 additional hours. Pictures were taken under a binocular 4 and 8 h after the beginning of the experiment and were used to measure the total length of germ tube(s) of a minimum of 15 spores for each repetition. Error bar: SE, n=5 (RispD_{ht}, n=3).

Figure 3. RispD induces cell culture alkalisation and is likely cleaved *in planta* (A) RispD_{ht} was added to poplar cell suspensions (*P. trichocarpa* x *P. deltoides* H11-11 hybrid) at a concentration of 1 μM and the pH was recorded at regular times as indicated. Error bars: SE, n=3. (B) Western blot showing the expression of Risp in poplar leaves. Ten to 20 ng of RispT_{ht} as well as 30 μg of proteins isolated from poplar leaves (15 μg of soluble proteins + 15 μg of insoluble proteins) were separated by 15% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. Anti-Risp antibodies were used for primary detection of Risp in the extracts by western blot. Well labels correspond to the conditions and time-points presented in Figure 1C. Risp has an atypical SDS-PAGE migration profile at \sim 12kDa instead of the expected 8kDa. * indicate the lane occupied by the pageruler (fermentas).

Figure 4. Redox status, thermostability and structural characterisation of recombinant Risp. (A) One hundred micromolar of non-treated RispT (RispT) as well as RispT boiled for 10 minutes (RispT95°C) or dithiothreitol (DTT)-reduced and boiled

for 10 minutes (Rispt-red-95°C) were plated with *Mlp* urediniospores to assess their ability to inhibit the germination. (B) CD spectra of Rispt_{ht} in aqueous solution (phosphate buffer pH 7.0, in black) or in the membrane-like solvent (80% TFE, in grey). Thick lines: smoothed curves (n=25), thin lines: curves established with raw CD data.

Figure 5. Recombinant Rispt attach to Mlp spores *in vitro*

Different recombinant proteins were included in a pull-down assay with *Mlp* urediniospores used as baits (see Figure S5 and material and methods for details on the assay). Recombinant proteins from the different fractions of the pull-down assay were visualized on 15% SDS-PAGE. St: Start (10µL from 500µL of solution of recombinant protein with spores before centrifugation), Sn: Supernatant (10 µL from 500µL of the supernatant of a centrifuged solution of recombinant protein with spores), W: Wash (10 µL from 500µL of supernatant after the first wash step), E: Elution (10µL from 100µL of supernatant of the centrifuged elution).

Figure 6. Recombinant Rispt can inhibit rust disease onto the surface of poplar leaves. (A) The upper part of a Beaupré leaf was inoculated with *Mlp* urediniospores (strain 98AG31, virulent on Beaupré) mixed with TE pH 8.0, whereas the lower part was inoculated with the same batch of urediniospores mixed with recombinant 100 µM Rispt. Pictures were taken 8 days-post inoculation. (B) Beaupré leaf disks were inoculated by pipet drop deposition with *Mlp* spores (strain 98AG31) mixed with ddHOH, TE pH 8.0 or 100µM Rispt and pictures were taken 8 days-post inoculation. (C) Selected areas of a Beaupré leaves were treated with 1 mL of ddHOH, TE pH 8.0 or 100 µM Rispt, and then the whole leaf was immediately inoculated by pulverisation with *Mlp* urediniospores (strain 98AG31). Pictures were taken just after inoculation as well as one, two or three weeks-post inoculation (wpi).

SUPPLEMENTAL DATA FILES

Table S1. Supplementary informations

(Sheet A) Attempts to identify Rispt in poplar leaves as well as Rispt protein partners from soluble protein fraction of poplar leaves infected with *Mlp*. (Sheet B) List of the conditions assayed by NMR spectroscopy to solve Rispt 3D structure. (Sheet C) Information relative to CD experiments. (Sheet D) Primers used for RT-qPCR

experiments. (Sheet E) Information relative to cloning, plasmid construction and heterologous protein expression.

Figure S1. *Risp* pseudo-homologs in plants. By using protein sequence homology searches, *Risp* pseudo-homologs (i.e. predicted proteins that presented sequence homology only in the signal peptide part and the first 4-5 amino acids of the mature form of *Risp*) have been identified in poplar (*P. trichocarpa*) as well as in phylogenetically-related plants such as the barbados nut (*Jatropha curcas*) and the castor oil plant (*Ricinus communis*). The phylogenetic tree was built on the phylogeny website (<http://www.phylogeny.fr>, default parameters) with the sequences presented in the alignment. Fully-conserved amino acids are shaded in red, partially conserved (≤ 5 amino acids) are shaded in gray, the black arrow indicate the predicted cleavage site of the signal peptide.

Figure S2. *Risp* do not inhibit the growth of *Laccaria bicolor* and *Magnaporthe oryzae* in vitro. (A) Urediniospores were plated on water-agar in petri dishes with ddHOH, TE pH 8.0, commercial 100 μ M BSA, 100 μ M AtGrxC1 and 100 μ M AtBola as well as immune sera. After 4.5 hours, a minimum of 300 urediniospores was observed and considered to calculate a percentage of germination. Error bar: SE, n=3 (except for AtBola, n=1). (B) Inhibition of *L. bicolor* mycelium growth assay. Drops of 10 μ L of 100 μ M *Risp*T, TE pH 8.0 or ddHOH were deposited directly onto the medium or on sterile paper disk on the periphery of the mycelium and picture was taken 8 days later (a). Close up of the picture presented in (a) are depicted in (b-c) as well as light microscope observation (40x) of the area in (d-e). A similar assay has been performed for *M. oryzae* (see Material and methods for details, data not shown) with similar results. (C) Inhibition of *M. oryzae* inoculum growth assay. Two mm³ implants from *M. oryzae* (a) and *L. bicolor* (b) growing mycelia were transferred on fresh medium and completely covered with 100 μ M *Risp*T, TE pH 8.0 or ddHOH solutions (or not treated as a control). Pictures were taken 8 days later. (D) Inhibition of *M. oryzae* spore germination assay. Spores of *M. oryzae* were placed in small glass cupules in solutions with 100 μ M *Risp*T_{ht}, TE pH 8.0 or ddHOH and pictures were taken 24 hours later.

Figure S3. Risp detection *in planta* by western blot. Ten micrograms of soluble proteins isolated from poplar leaves were separated by 15% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. Anti-Risp antibodies as well as pre-immune and depleted sera were used for primary detection of Risp in the extracts by western blot. Well labels correspond to the conditions and time-points presented in Figure 1C.

Figure S4. Redox-independent fold of recombinant RispT

Circular dichroism (CD) spectra of oxidized (in black) and artificially reduced (in grey) RispT_{ht}. Thick lines: smoothed curves (n=25), thin lines: curves established with raw CD data.

Figure S5. Inability of Risp-GFP fusions to bind *Mlp* spores *in vitro*

(B) *Mlp* urediniospores were incubated 15 minutes with recombinant GFP and RispT-gfp_{ht} or not (no proteins) and immediately observed under epifluorescence microscope.

Figure S6. Inhibition of rust disease by exogenous application of recombinant RispT on poplar leaves. Selected areas of a Beaupré leaf were treated with 500µL of ddHOH, TE pH 8.0 or 100 µM RispT and the whole leaf were inoculated by pulverisation with *Mlp* spores (strain 98AG31) 3 (A) and 5 (B) days later. Pictures were taken just after area localized treatments as well as one or two weeks-post inoculation (wpi).

Figure 1

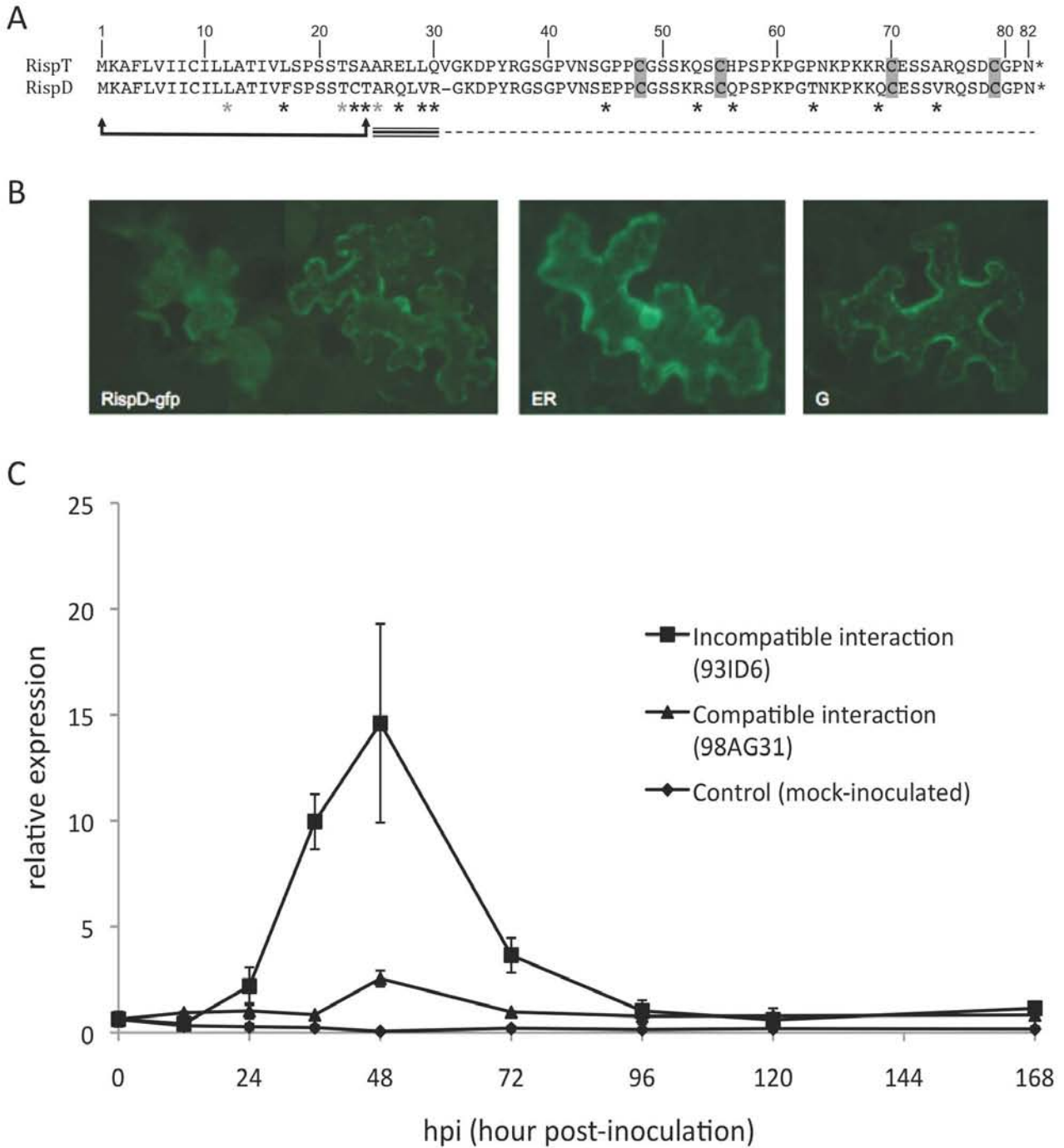


Figure 2

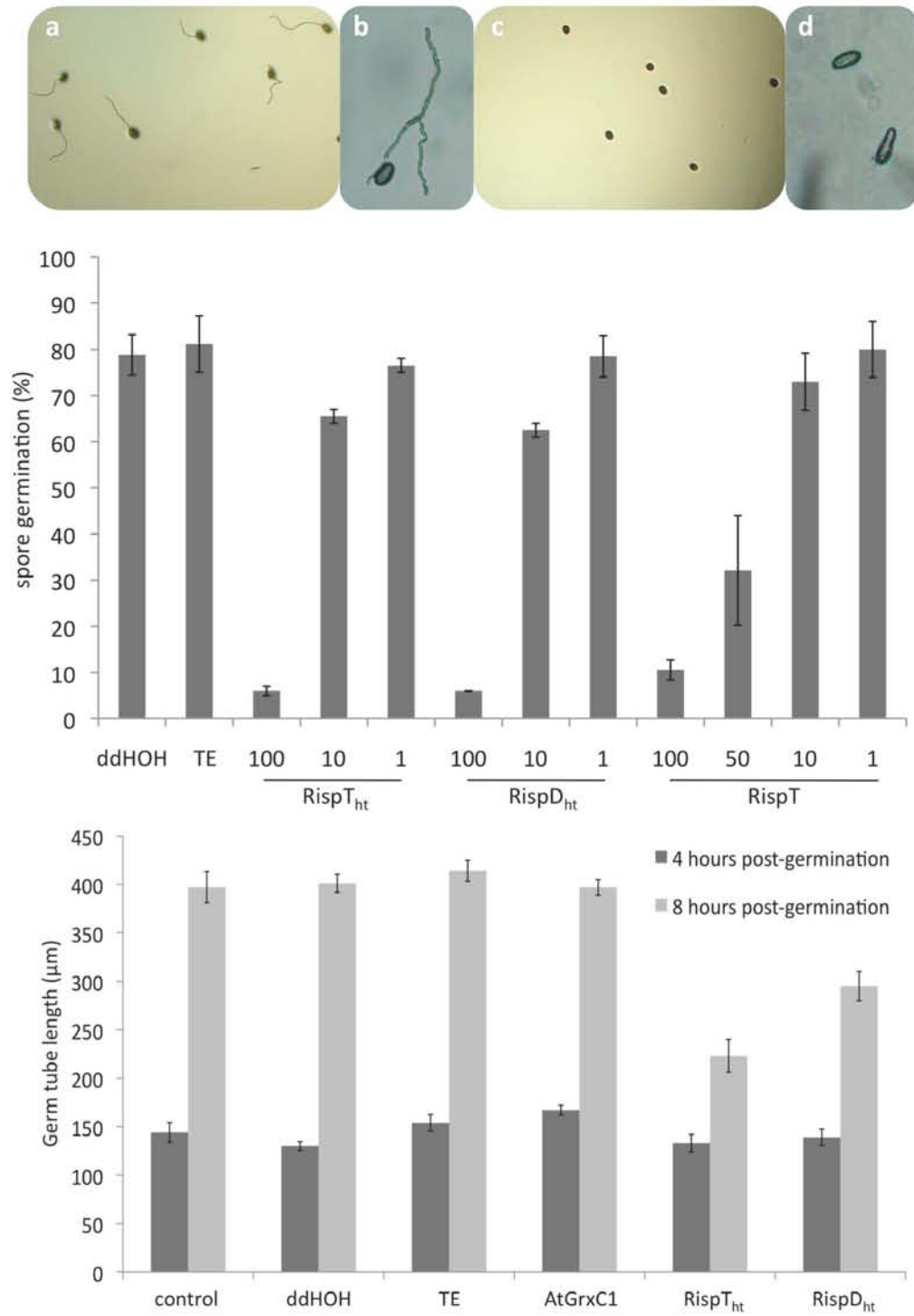


Figure 3

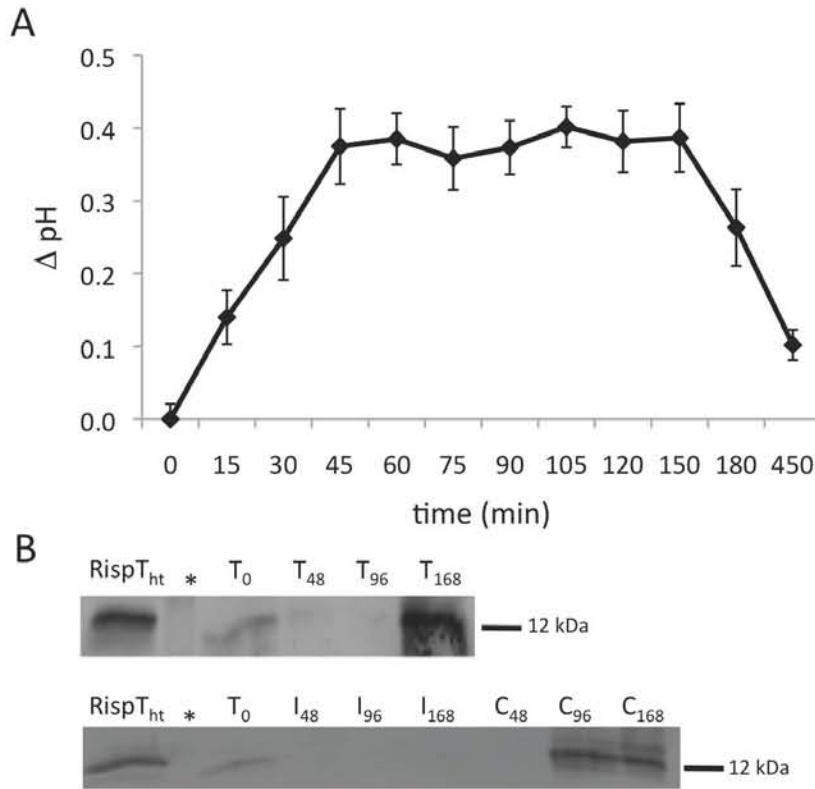


Figure 4

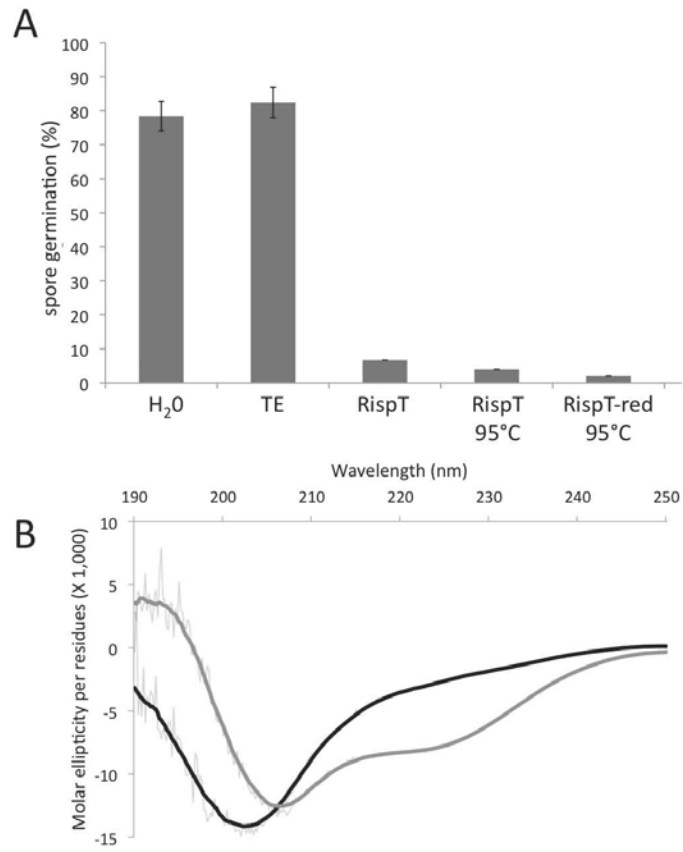


Figure 5

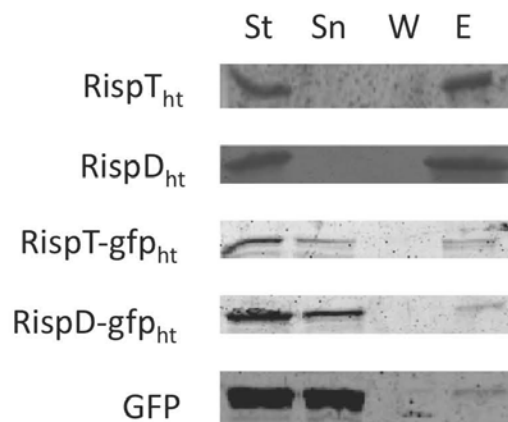


Figure 6

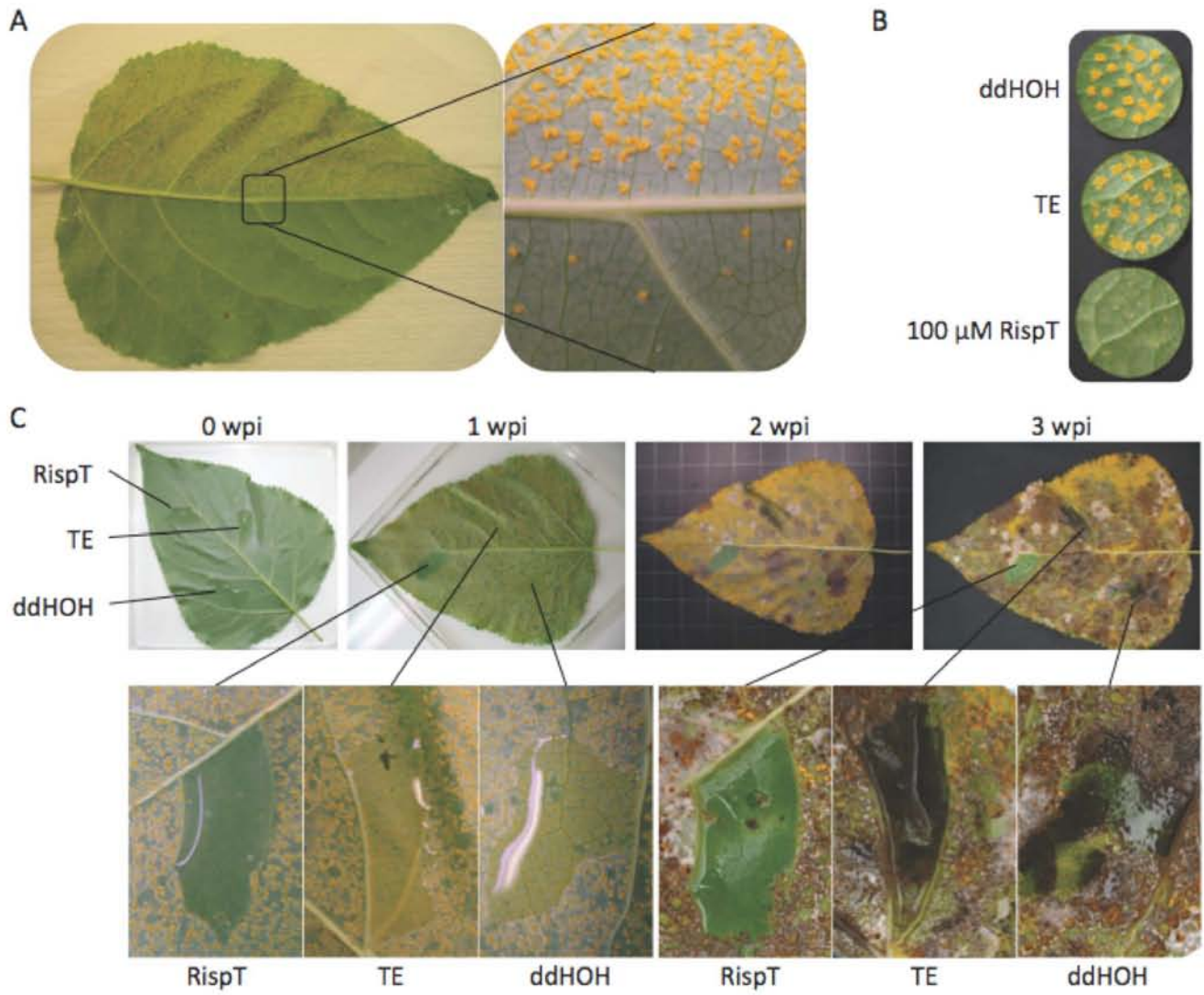


Figure S1

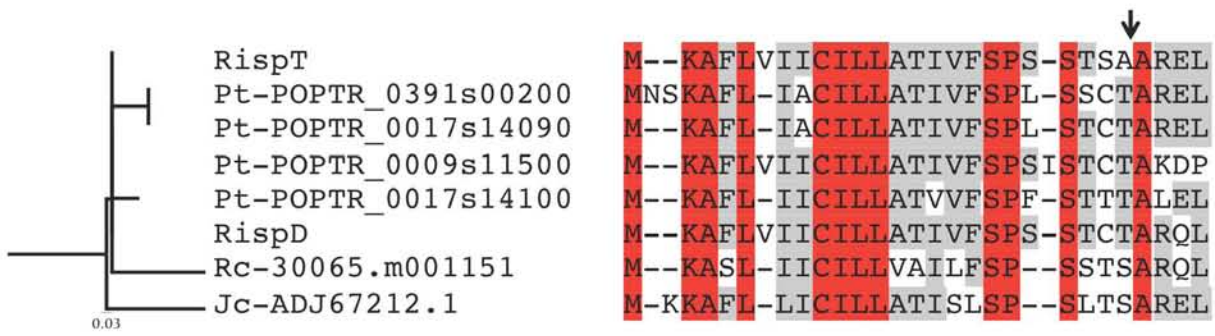


Figure S2

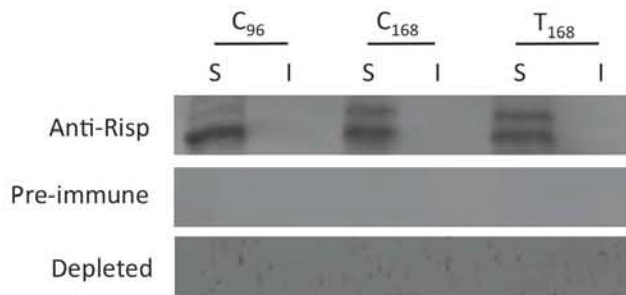


Figure S3

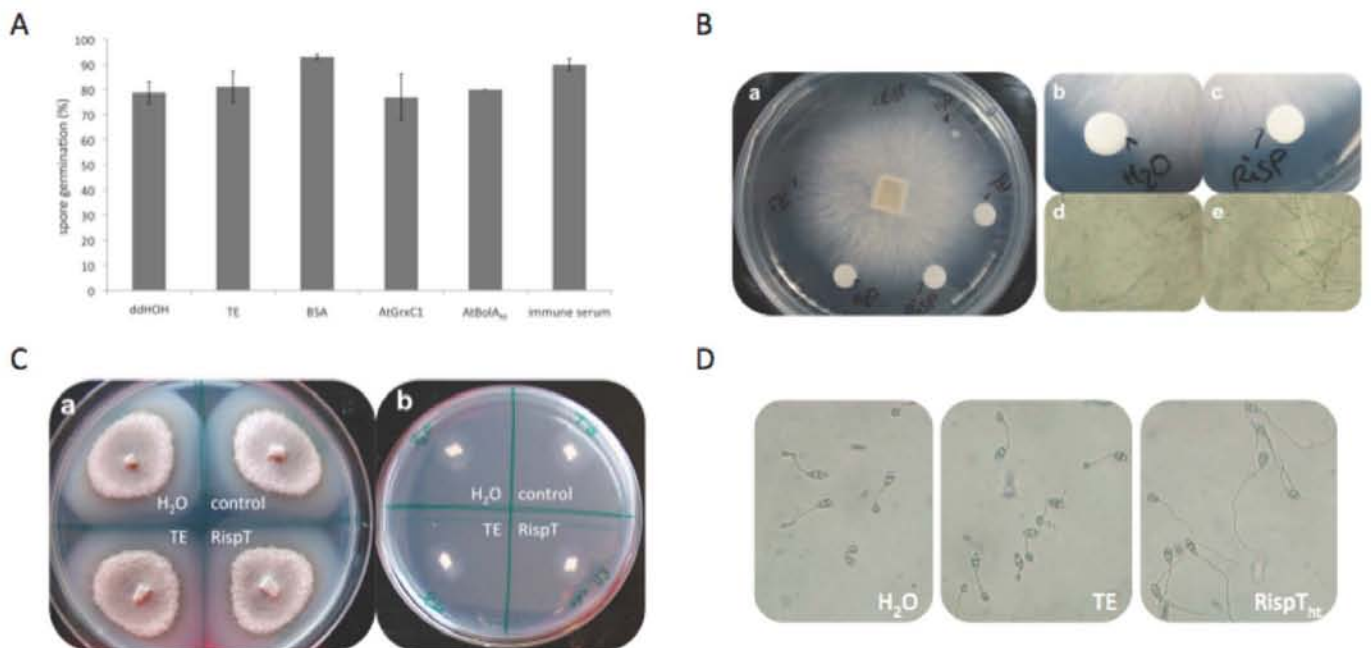


Figure S4

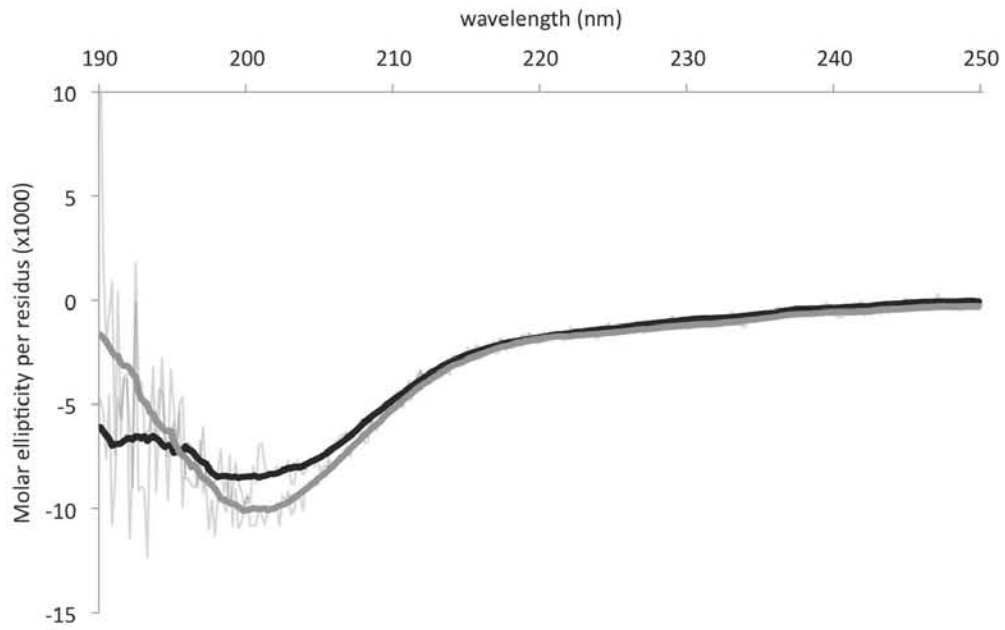
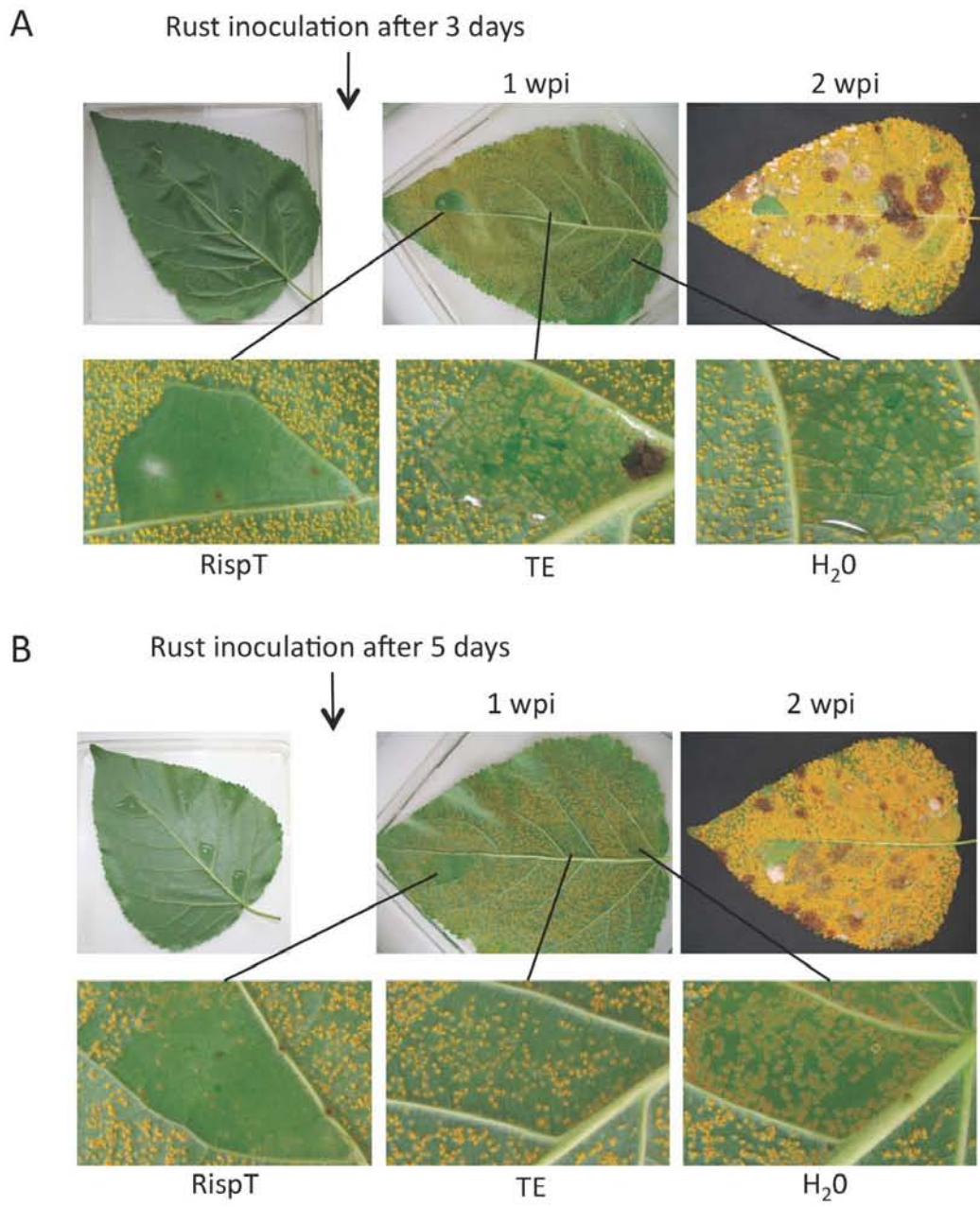


Figure S5



Figure S6



CHAPITRE VI : Analyse des effecteurs candidats de *Melampsora larici-populina*

CHAPITRE VI

Analyse des effecteurs candidats de *Melampsora larici-populina*

Résumé du chapitre VI

Analyse des effecteurs candidats de *Melampsora larici-populina*

La biotrophie est un mode de vie qui requiert une manipulation systématique du système immunitaire de l'hôte infecté. Chez les champignons biotrophes, les quelques effecteurs étudiés à ce jour sont majoritairement des petites protéines sécrétées. En tant que parasite biotrophe, on suppose que *M. larici-populina* sécrète des effecteurs pour manipuler son hôte. Néanmoins, à ce jour, aucun effecteur n'a été décrit. Le séquençage du génome de *M. larici-populina* a permis de réaliser l'identification d'effecteurs candidats, en annotant de manière systématique les 1184 petites protéines sécrétées (small-secreted proteins, SSP) prédites au sein de la séquence génomique. A cela ont été associés l'analyse de l'expression, de l'évolution et des homologues avec des effecteurs déjà décrits chez d'autres agents de rouille. Notamment, les familles de gènes MlpP4 (CPG5464) et MlpH1 (CPGH1) codent des SSP modulaires, avec des régions N-terminales relativement conservées et des régions C-terminales riches en cystéines et présentant des signatures d'évolution sous pression de sélection positive. Les 13 membres de la famille MlpP4 sont homologues des facteurs d'avirulence AvrP4 de *M. lini*, tandis que les 31 membres de la famille MlpH1 n'ont pas d'homologues connus dans les bases de données. Deux membres de chaque famille (MlpP4.1, MlpP4.2, MlpH1.1 et MlpH1.2) sont fortement induits durant l'infection, et ont été analysés en priorité. Ces quatre effecteurs candidats augmentent la virulence des bactéries *P. syringae* quand ils sont délivrés à l'intérieur des cellules foliaires d'*A. thaliana* au moyen du système de sécrétion de type III. Les protéines recombinantes correspondant à MlpP4.1 et MlpH1.1 ont été produites dans *E. coli*. Elles ont été utilisées comme appâts dans des 'pull-down' pour identifier des partenaires protéiques *in planta*. Enfin, la caractérisation biochimique et structurale de ces protéines recombinantes est en cours.

Ce chapitre de thèse comporte 2 manuscrits.

Le premier est un article de recherche rédigé en anglais et intitulé '***A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identified Candidate Effectors in Melampsora larici-populina (Poplar Leaf Rust)***', publié en mars 2012 dans la revue 'Molecular Plant-Microbe Interactions – MPMI' et dont je suis le dixième auteur. Ce projet a été principalement mené à bien par deux doctorants, Stéphane Hacquard (UMR IAM) et David Joly (Natural Resources Canada, Québec, Canada). J'ai modestement participé à ce projet en exécutant des analyses d'expression des membres des familles MlpP4 et MlpH1 par RT-qPCR et par western blot. Je me suis investi dans la phase finale de rédaction du manuscrit.

Le second manuscrit est un article de recherche en préparation qui nécessite encore de finaliser certaines expériences et s'intitule '***Poplar leaf rust candidate effectors: virulence activities, structural characterization and plant targets***'. Dans le cadre de cette étude, j'ai eu l'occasion d'effectuer les tests de virulence en pathosystème hétérologue *A. thaliana/P. syringae* pv *tomato* DC3000 ainsi que les mutants d'arabidopsis au sein du laboratoire d'Armand Séguin (voir chapitre III), en étroite collaboration avec Hugo Germain. Le reste du projet a été effectué dans l'UMR IAM à Nancy.

Article n° 6 : A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identifies Candidate Effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust)

Stéphane Hacquard, David L. Joly, Yao-Cheng Lin, Emilie Tisserant, Nicolas Feau, Christine Delaruelle, Valérie Legué, Annegret Kohler, Philippe Tanguay, **Benjamin Petre**, Pascal Frey, Yves Van de Peer, Pierre Rouzé, Francis Martin, Richard C. Hamelin, Sébastien Duplessis

Article publié en mars 2012 dans la revue 'Molecular Plant-Microbe Interaction – MPMI'
doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0238

Quinze fichiers de matériel supplémentaires sont disponibles sur le site Internet du journal MPMI

<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-09-11-0238>

A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identifies Candidate Effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust)

Stéphane Hacquard,¹ David L. Joly,² Yao-Cheng Lin,³ Emilie Tisserant,¹ Nicolas Feau,² Christine Delaruelle,¹ Valérie Legué,¹ Annegret Kohler,¹ Philippe Tanguay,² Benjamin Petre,¹ Pascal Frey,¹ Yves Van de Peer,³ Pierre Rouzé,³ Francis Martin,¹ Richard C. Hamelin,^{2,4} and Sébastien Duplessis¹

¹Unité Mixte de Recherche 1136 Institut National de la Recherche Agronomique-Nancy Université, Interactions Arbres/Micro-organismes, INRA Nancy, 54280 Champenoux, France; ²Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre, 1055 du PEPS, P.O. Box 10380, Stn. Sainte-Foy, Québec, QC, G1V 4C7, Canada; ³Department of Plant Systems Biology, VIB, Ghent University, 9052 Ghent, Belgium; ⁴Department of Forest Sciences, Faculty of Forestry, University of British Columbia, Vancouver, BC, V6T 1Z4, Canada

Submitted 15 September 2011. Accepted 26 October 2011.

The obligate biotrophic rust fungus *Melampsora larici-populina* is the most devastating and widespread pathogen of poplars. Studies over recent years have identified various small secreted proteins (SSP) from plant biotrophic filamentous pathogens and have highlighted their role as effectors in host–pathogen interactions. The recent analysis of the *M. larici-populina* genome sequence has revealed the presence of 1,184 SSP-encoding genes in this rust fungus. In the present study, the expression and evolutionary dynamics of these SSP were investigated to pinpoint the arsenal of putative effectors that could be involved in the interaction between the rust fungus and poplar. Similarity with effectors previously described in *Melampsora* spp., richness in cysteines, and organization in large families were extensively detailed and discussed. Positive selection analyses conducted over clusters of paralogous genes revealed fast-evolving candidate effectors. Transcript profiling of selected *M. larici-populina* SSP showed a timely coordinated expression during leaf infection, and the accumulation of four candidate effectors in distinct rust infection structures was demonstrated by immunolocalization. This integrated and multifaceted approach helps to prioritize candidate effector genes for functional studies.

Worldwide, *Melampsora* spp. (Basidiomycota, Pucciniales) are the most devastating pathogens of poplars (Steenackers et al.

1996), and *Melampsora larici-populina* is a major threat in European poplar plantations (Pinon and Frey 2005). Like many other rust fungi, *M. larici-populina* has a complex life cycle which includes five different spore types and requires two phylogenetically distinct host plants; here, *Populus* and *Larix* spp. It is also an emerging model organism in forest pathology because this is one of the first rust fungi to have its genome sequenced, and one of the rare pathosystems for which both host and pathogen genomes are available (Duplessis et al. 2009; Feau et al. 2007; Hacquard et al. 2011a). Moreover, *M. larici-populina* is also a close relative of *Melampsora lini*, the causal agent of flax rust, which is often considered to be the model rust species. After genetic studies demonstrating that single pairs of allelic genes determine the avirulence or virulence phenotype on host lines with particular resistance genes (i.e., the “gene-for-gene” hypothesis) (Flor 1955), avirulence factors were identified in *M. lini* and their direct interaction with flax resistance (R) proteins was demonstrated (Ravensdale et al. 2011).

In order to manipulate host defenses and enable parasitic colonization, many prokaryotic and eukaryotic biotrophic plant pathogens have evolved highly advanced strategies to deliver suites of effector proteins into host cells during infection (Dodds and Rathjen 2010). In turn, their hosts have evolved diverse families of R proteins, which confer resistance via effector-triggered immunity (ETI) after recognition of specific effector proteins, dubbed avirulence (Avr) proteins (Dodds et al. 2009; Jones and Dangl 2006). Unlike the extensively characterized bacterial type III secretion system (Zhou and Chai 2008), little is known about the cellular machineries responsible for translocation of filamentous pathogen effectors into host cells. However, recent studies demonstrated that some small regions within the N-terminal part of oomycete and fungal effectors are required for translocation into host cells in a pathogen-independent manner, suggesting that a host-encoded process is responsible for effector internalization (Kale et al. 2010; Rafiqi et al. 2010). The exact function of conserved N-terminal host cell entry motifs such as RXLR in oomycetes, as well as their presence in fungal effectors, remains unclear and needs to be clarified (Ellis and Dodds 2011; Rafiqi et al. 2010; Yaeno et al. 2011). Many biotrophic fungi and oomycetes are known to share a common infection process involving the formation of haustoria, which invaginate and engage intimate contact with the plasma membrane of

S. Hacquard and D. L. Joly contributed equally to this work.

Current address for S. Hacquard: Max Planck Institute for Plant Breeding Research, 50829 Cologne, Germany.

Current address for D. L. Joly: Agriculture and Agri-Food Canada, Pacific Agri-Food Research Centre, Summerland, BC, V0H 1Z0, Canada.

Current address for N. Feau: Department of Forest Sciences, Faculty of Forestry, University of British Columbia, Vancouver, BC, V6T 1Z4, Canada.

Corresponding author: S. Duplessis; Telephone: +33 383 39 40 13; Fax: +33 383 39 40 69; E-mail: duplessi@nancy.inra.fr

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that 11 supplementary figures and four supplementary tables are published online. Figures 2 and 3 also appear in color online.

host cells (Dodds et al. 2009). Haustoria have been studied for their role in nutrient acquisition and metabolism (Voegele and Mendgen 2003; Voegele et al. 2009), and there is now evidence to suggest that these structures play crucial roles in the delivery of virulence effectors (Catanzariti et al. 2006; Dodds et al. 2009; Panstruga and Dodds 2009).

The rapid increase in the number of sequenced fungal and oomycete genomes offers the opportunity to predict the whole complement of secreted proteins (i.e., secretomes). Most secreted proteins expressed specifically in planta are candidate effectors, and there is an expanding effort to define their roles in virulence (Ellis et al. 2009). The genome sequence of the biotrophic fungus *Ustilago maydis* has revealed the presence of a large set of lineage-specific secreted effectors arranged in clusters (Kämper et al. 2006). Interestingly, most of these appear to be upregulated during biotrophic development, and some disruptive mutants were significantly altered in virulence (Brefort et al. 2009; Doehlemann et al. 2009; Kämper et al. 2006). In oomycetes, comparison of three *Phytophthora* genomes showed rapid turnover and extensive expansion of specific families of genes encoding secreted effector proteins (Haas et al. 2009; Raffaele et al. 2010; Tyler et al. 2006). Many of these genes, including the host-translocated RXLR-containing proteins, were shown to be induced during infection and encode proteins with activities predicted to alter host physiology (Baxter et al. 2010; Morgan and Kamoun 2007). Although most plant R proteins and downstream signaling pathways share a conserved nature, the array of structures and functions of effector proteins is highly diverse, preventing *ab initio* identification from sequence and expression data information alone (Ellis et al. 2009). In many cases, the only recognizable features are the presence of an N-terminal signal sequence for secretion through the endomembrane pathway and an even number of cysteine residues that may be involved in the formation of disulfide bonds. Effectors frequently have novel sequences and no obvious homologues in more remotely related species (Göhre and Robatzek 2008; Rep 2005), although some, especially among Cys-rich proteins of *Cladosporium fulvum*, are true exceptions to this rule (Bolton et al. 2008; de Jonge et al. 2010; Stergiopoulos et al. 2010). Moreover, consistent with the model of a coevolutionary arms race between actors of the plant immune system and effectors from these pathogens, nucleotide sequences coding for many of these secreted proteins exhibit accelerated evolutionary rates (Brunner et al. 2009; Dodds et al. 2006; Guttman et al. 2006; Win et al. 2007). Another singular—but not exclusive—feature of secreted effector proteins described in fungal plant pathogens is their low molecular weight (Stergiopoulos and de Wit 2009).

The whole-genome draft sequence of *M. larici-populina* 98AG31 consists of 101.1 megabases encoding 16,399 predicted proteins, among which a total of 1,184 small secreted proteins (SSP) (<300 amino acids) was identified (Duplessis et al. 2011a). Although most of the SSP-encoding genes are lineage specific (84%), several present homologues with effectors previously described in the Pucciniales order. Strikingly, 63% of the SSP have more than four Cys residues, including the most expanded SSP-encoding gene family of 111 members (Duplessis et al. 2011a). This large family harbors a conserved YXC motif similar to a motif identified in secreted proteins of the powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* and in rust fungi belonging to the genus *Puccinia* (Godfrey et al. 2010; Spanu et al. 2010).

In this study, complementary to the *M. larici-populina* genome analysis (Duplessis et al. 2011a), we report the detailed annotation and genome-wide analysis of *M. larici-populina* SSP-encoding genes. Features such as homology with known effectors, amino acid content, and organization into multigene

families are scrutinized. By unraveling the expression and evolutionary dynamics of SSP, fungal genes specifically expressed in planta and exhibiting the hallmarks of positive selection due to coevolutionary arms races with host factors are identified. Moreover, immunolocalization of selected SSP suggests specificity of secretion from different fungal cell types in planta.

RESULTS

M. larici-populina homologues of rust effectors.

Of the 22 effectors previously described in rust fungi (Catanzariti et al. 2006; Dodds et al. 2004; Kemen et al. 2005), 20 were identified in *M. larici-populina* (Duplessis et al. 2011a). Of these 20 effectors, 12 belong to multigenic families, representing a total of 63 homologues of conserved rust effectors in *M. larici-populina* (Table 1). In all, 8 and 13 divergent homologues of *M. lini* *AvrM* and *M. lini* *AvrP4*, respectively, were detected. Six of the *AvrM* paralogs were found to reside in three tandem pairs, with intergenic regions showing similarity to Pfam domains associated with transposable elements (Supplementary Fig. S1). A phylogenetic tree incorporating *AvrP4* sequences from multiple *Melampsora* spp. (Van der Merwe et al. 2009) illustrates the high sequence divergence of *M. larici-populina* *AvrP4* homologues, which lay together in a supported clade (Fig. 1). This suggests duplication and diversification from a unique ancestor of *AvrP4* toward the multigenic family herein presented. As described by Van der Merwe and associates (2009), amino acids at the C-terminal end were highly variable apart from the six Cys residues spaced according to the consensus of a cystine-knot, a structure also found in *Avr9* from *C. fulvum* (van den Hooven et al. 2001), as well as in toxic and inhibitory polypeptides (Pallaghy et al. 1994). In contrast, only one homologue of *M. lini* *AvrP123* and one homologue of *M. lini* *AvrL567* were identified in the genome of *M. larici-populina*. Strikingly, the 26- to 50-amino acid region containing the translocation signal RFYR identified in *M. lini* *AvrL567* (Rafiqi et al. 2010) is not conserved in the *M. larici-populina* homologue. However, the deduced *M. larici-populina* *AvrL567* homologue protein threads onto the *M. lini* *AvrL567* structure (Wang et al. 2007), indicating that the two proteins might share common structural features (Supplementary Fig. S2). In contrast with the strong diversifying selection reported for the *M. lini* *AvrL567* loci (Dodds et al. 2004, 2006), a low level of polymorphism as well as an absence of diversifying selection were observed between the six allelic variants identified from 32 *M. larici-populina* isolates (Supplementary Fig. S3). Moreover, no correlation could be established between allelic variants and avirulence phenotypes on a differential set of poplar cultivars with characterized resistance genes (Pinon and Frey 2005). Of the three homologues of the *Uromyces fabae* rust transferred protein (RTP1) identified in *M. larici-populina* (Duplessis et al. 2011a), the N-terminal region of one RTP1 homologue was identical to the haustorially expressed secreted protein (HESP) HESP-327 from *M. lini* (Table 1), which is consistent with the conserved C-terminal region and the more diverse N-terminal region previously reported for RTP1 in other rust fungi (Fernandez et al. 2012; Kemen et al. 2005; Puthoff et al. 2008). *In silico* localization analyses suggested that only the HESP327/RTP1 protein contains a predicted nuclear localization signal. A large proportion of the 63 genes encoding conserved rust effectors were expressed during plant infection (30 genes) compared with urediniospores (10 genes) (Table 1).

Cys-rich proteins dominate the secretome of *M. larici-populina*.

Of the 1,184 SSP identified in *M. larici-populina*, 746 had a number of Cys residues greater than four (Duplessis et al.

Table 1. Conserved rust effectors in *Melampsora larici-populina* 98AG31

Protein ^a	Scaffold and strand	Length (amino acids)	Putative effector hit ^b	Species ^b	Identities (%)	Positives (%)	Transcript evidence in <i>M. larici-populina</i>		
							Spores	Infected leaves	Haustoria
58459	1-	175	HESP-178	<i>Melampsora lini</i>	29	55	...	X	...
33341	3-	146	HESP-178	<i>M. lini</i>	89	91
117398	37+	207	HESP-178	<i>M. lini</i>	26	46	X	X	...
103805	7-	411	HESP-270	<i>M. lini</i>	75	85	...	X	X
123932	17-	405	HESP-327	<i>M. lini</i>	92	96	...	X	...
			Rust transferred protein 1	<i>Uromyces fabae</i>	59	76
123524	23-	216	Rust transferred protein 1	<i>U. fabae</i>	48	63	...	X	...
123523	31-	238	Rust transferred protein 1	<i>U. fabae</i>	50	59
124544	28+	140	HESP-376	<i>M. lini</i>	47	63	...	X	...
64764	28+	154	HESP-376	<i>M. lini</i>	27	45
70587	2+	207	HESP-379	<i>M. lini</i>	86	90	X	X	...
93569	5-	134	HESP-417	<i>M. lini</i>	36	52	X	X	X
71399	11-	132	HESP-417	<i>M. lini</i>	29	52	X	X	...
74496	11+	132	HESP-417	<i>M. lini</i>	30	50	X	X	...
71402	11+	135	HESP-417	<i>M. lini</i>	30	51	X	X	...
71404	11+	128	HESP-417	<i>M. lini</i>	76	81	X	X	...
108269	28-	136	HESP-417	<i>M. lini</i>	24	44
35858	17+	234	HESP-570	<i>M. lini</i>	55	65
53986	69-	226	HESP-570	<i>M. lini</i>	65	76
90824	3-	415	HESP-735 (recursive tblastn)	X	X
141065	7-	223	HESP-735	<i>M. lini</i>	90	94
85525	14+	220	HESP-735 (recursive tblastn)	X	...
42266	6-	85	HESP-767	<i>M. lini</i>	100	100	X	X	...
110232	42+	142	HESP-897	<i>M. lini</i>	87	92	X	X	...
101424	1+	186	HESP-C49 (recursive tblastn)
71126	7+	178	HESP-C49	<i>M. lini</i>	82	86	X	X	...
104797	11+	219	HESP-C49 (recursive tblastn)
85995	16+	492	HESP-C49 (recursive tblastn)	X	...
123438	16+	179	HESP-C49 (recursive tblastn)	X	...
123437	16+	179	HESP-C49 (recursive tblastn)	X	X
124076	19-	121	HESP-C55	<i>M. lini</i>	72	84
124415	52+	353	HESP-C61	<i>M. lini</i>	55	70	X
124414	52+	284	HESP-C61	<i>M. lini</i>	35	53	...	X	...
101608	2-	185	HESP-C63	<i>M. lini</i>	27	44
101611	2+	203	HESP-C63	<i>M. lini</i>	25	46
63837	22-	175	HESP-C63 (recursive tblastn)	X	...
123443	22-	203	HESP-C63	<i>M. lini</i>	24	42	...	X	...
65539	35-	201	HESP-C63	<i>M. lini</i>	51	69
34793	10+	76	HESP-C66	<i>M. lini</i>	58	69
34673	10-	74	HESP-C66	<i>M. lini</i>	56	69
37534	30+	77	HESP-C66	<i>M. lini</i>	52	70	...	X	...
37347	29+	151	AvrL567	<i>M. lini</i>	61	44
124207	2+	545	AvrM	<i>M. lini</i>	50	33
124206	12-	568	AvrM	<i>M. lini</i>	53	36
124204	35+	461	AvrM	<i>M. lini</i>	39	25
124205	35+	448	AvrM	<i>M. lini</i>	53	36
124203	65-	518	AvrM	<i>M. lini</i>	54	32
124202	65-	413	AvrM	<i>M. lini</i>	47	31	X
124208	77-	702	AvrM	<i>M. lini</i>	52	36
124209	77-	687	AvrM	<i>M. lini</i>	42	28	X
124530	78-	122	AvrP123	<i>M. lini</i>	40	29
124258	3-	95	AvrP4	<i>M. lini</i>	67	57
124268	3-	90	AvrP4	<i>M. lini</i>	43	30
124272	3+	97	AvrP4	<i>M. lini</i>	50	34
124262	5+	101	AvrP4	<i>M. lini</i>	62	52
124264	10+	89	AvrP4	<i>M. lini</i>	60	47	...	X	...
124270	15+	89	AvrP4	<i>M. lini</i>	50	38
124256	18-	88	AvrP4	<i>M. lini</i>	58	44	...	X	...
124266	19-	92	AvrP4	<i>M. lini</i>	63	47	...	X	...
124260	35-	92	AvrP4	<i>M. lini</i>	63	47
124254	39-	90	AvrP4	<i>M. lini</i>	67	52
124274	51+	97	AvrP4	<i>M. lini</i>	54	34
112294	64-	105	AvrP4	<i>M. lini</i>	52	30
124252	167+	96	AvrP4	<i>M. lini</i>	72	51

^a Protein ID: number of corresponding best predicted gene model in the *M. larici-populina* Joint Genome Institute genome sequence.

^b Homologues of putative and characterized rust effectors were searched in the *M. larici-populina* genome by tblastn using the sequences of the *M. lini* haustorially expressed secreted proteins (HESP) and avirulence (Avr) proteins and the *U. fabae* rust transferred protein 1. Recursive tblastn searches were performed using those *M. larici-populina* putative effector sequences. Percentages of identities and positives were assessed following blastp searches carried out against UNIPROT (*E* value < 1e-5).

2011a). Among those, 228 SSP showed a conserved exon and intron structure and a characteristic spacing of Cys residues, as previously reported by Duplessis and associates (2011a) for the largest *M. larici-populina* SSP-encoding gene family. Based on sequence homology, these 228 SSP were grouped into 28 classes (Table 2; Supplementary Table S1). Of those 228 Cys-rich SSP-encoding genes, 99 lay in close vicinity to another member or putative pseudogene of the same class (no more than five genes apart), indicating that they might have arisen by tandem duplication. Apart from classes VI and XIV, which contained the *M. lini* HESP-C49 and HESP-897 homologues, respectively, only one more class had homology to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Although significant variability was observed with respect to spacing and number of Cys residues within the 28 classes, most of those SSP-encoding genes shared a general structure of five exons, with the first full codon of exons 2, 4, and 5 encoding a Cys residue, as previously reported for the largest *M. larici-populina* SSP-encoding gene family

(Duplessis et al. 2011a). By comparing the conservation profile from the eight largest classes of Cys-rich SSP, specific protein positions were found to be enriched in particular amino acid residues across classes (Fig. 2). In many cases, Tyr residues were found before conserved Cys number 3 and 8 (YXC) and after conserved Cys number 6 (CX₂₋₃Y). In order to assess the importance of these Cys and their surrounding residues, two types of sequence randomization tests were used to verify the significance of the YXC and CX₂₋₃Y motifs. First, the observed location and frequency of the YXC and CX₂₋₃Y motifs in the real SSP sequences were compared with randomly shuffled sequences. By plotting all motif locations (excluding the signal peptide) in each class compared with the random data set, both YXC and CX₂₋₃Y motifs showed strong position preferences (Fig. 2; Supplementary Fig. S4). Furthermore, the observed frequency of YXC and CX₂₋₃Y motifs in the true SSP classes I, II, III, and XXIV was significantly higher than in the random data set (*P* value < 0.01). In a second test, hidden Markov models

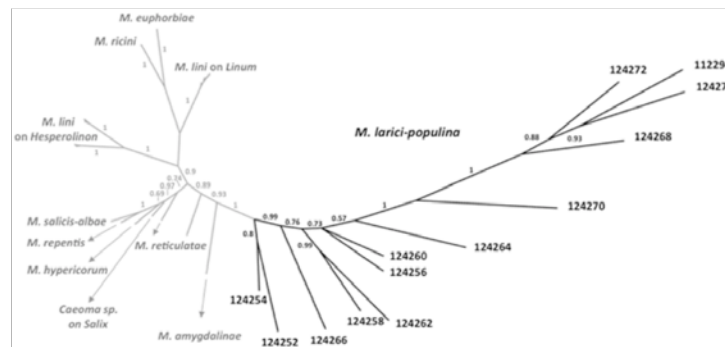


Fig. 1. Unrooted Bayesian consensus tree of AvrP4 homologues. AvrP4 homologues were identified in the genome sequence of *Melampsora larici-populina* strain 98AG31 (in black) and obtained from diverse *Melampsora* spp. (Van der Merwe et al. 2009) (in gray). Values above branches correspond to posterior probabilities associated with the branch supporting a particular clade. *M. larici-populina* genes encoding protein ID numbers 124268 and 124272 are located in tandem. The other AvrP4 homologues are scattered over the *M. larici-populina* genome.

Table 2. *Melampsora larici-populina* small secreted proteins classes with characteristic Cys patterns

Class	Number of genes	Length (amino acids)	Cys pattern	Top blast hit ^a
I ^b	111	107 to 155	CX ₉₋₁₉ CX ₈₋₁₉ CX ₄ CX ₁₂₋₁₆ CX ₉₋₁₇ CX ₁₁₋₁₈ CX ₈₋₁₄ CX ₈₋₁₃ CX ₁₋₅ C	...
II	39	133 to 157	CX ₃₋₂₁ CX ₈₋₂₂ CX ₂ CX ₁₂ CX ₁₃₋₁₈ CX ₁₅₋₂₁ CX ₁₀₋₁₄ CX ₈ CX ₂₋₄ C	...
III	8	134 to 367	CX ₁₂ CX ₅₋₇ CX ₃ CX ₈₋₉ CX ₁₂₋₂₈ CX ₁₃ CX ₈ CX ₉₋₁₁ CX ₂ C	PGTG_20247.2
IV	5	154 to 159	CX ₁₄₋₁₇ CX ₈₋₁₀ CX ₄ CX ₂₀₋₂₃ CX ₅₁₋₅₄ CX ₆ CX ₄ C	...
V	6	128 to 149	CX ₁₁₋₁₄ CX ₉₋₁₃ CX ₁₃ CX ₁₁₋₁₄ CX ₁₁₋₁₈ CX ₁₃₋₁₆ CX ₈ C	...
VI	6	178 to 492	CX ₂₁₋₂₂₂ CX ₁₀ CX ₄ CX ₅ CX ₂ CX ₁₃₋₂₃ CX ₉ CX ₃ CX ₅ CX ₂	HESP-C49 (<i>M. lini</i>); PGTG_08705.2
VII	5	142 to 149	CX ₁₅₋₁₇ CX ₁₂₋₁₃ CX ₄ CX ₇ CX ₁₄₋₁₅ CX ₁₃₋₁₅ CX ₉ CX ₅₋₇ CX ₁₀₋₁₃ CX ₈ CX ₂ C	...
VIII	4	141 to 154	CX ₁₃₋₁₄ CX ₂₆₋₂₈ CX ₁₃₋₁₄ CX ₂ CX ₈ CX ₁₅ CX ₁₈₋₁₉ CX ₇₋₈ CX ₈ CX ₂ C	...
IX	3	186 to 507	CX ₂₃ CX ₉ CX ₂ CX ₂₂₋₃₀ CX ₁₆₋₁₇ CX ₁₃₋₁₄ CX ₉ CX ₁₂₋₁₃ CX ₂ C	...
X	3	167 to 180	CX ₁₆ CX ₉ CX ₄ CX ₂₀₋₂₁ CX ₅₄₋₅₅ CX ₁₂ CX ₂ C	...
XI	4	144 to 153	CX ₁₂₋₁₆ CX ₈₋₁₀ CX ₂ CX ₉₋₁₀ CX ₂₃₋₂₈ CX ₁₀₋₁₁ CX ₁₆ CX ₁₀₋₁₁ CX ₁₀₋₁₁ CX ₂ C	...
XII	3	133 to 139	CX ₆₋₇ CX ₁₃₋₁₅ CX ₁₅₋₂₀ CX ₁₂ CX ₁₇₋₁₈ CX ₁₇₋₁₈ CX ₉ CX ₁₀₋₁₁ C	...
XIII	2	120 to 127	CX ₂₁ CX ₄ CX ₂ CX ₁₁₋₁₈ CX ₁₁ CX ₉ CX ₉ CX ₈ CX ₄ C	...
XIV	1	142	CX ₁₆ CX ₈ CX ₂ CX ₈ CX ₁₈ CX ₁₇ CX ₉ CX ₈ CX ₂ C	HESP-897 (<i>M. lini</i>); PGTG_06517.2
XV	2	203 to 221	CX ₂₅ CX ₈ CX ₄ CX ₁₃ CX ₈ CX ₅₀₋₅₆ CX ₁₁ CX ₈ CX ₂ C	...
XVI	2	114 to 116	CX ₁₈₋₂₁ CX ₁₃₋₁₄ CX ₉₋₁₀ CX ₄ CX ₈ CX ₇ CX ₁₅ CX ₁₀ CX ₇ CX ₄ C	...
XVII	2	124 to 130	CX ₅₋₆ CX ₁₃ CX ₉₋₁₄ CX ₄ CX ₈₋₁₀ CX ₁₈ CX ₁₃ CX ₁₁ CX ₇ CX ₂ C	...
XVIII	1	199	CX ₂₂ CX ₃₈ CX ₉ CX ₂ CX ₁₆ CX ₃₁ CX ₂₀ CX ₁₀ CX ₈ CX ₂ C	...
XIX	2	130 to 133	CX ₃₋₅ CX ₁₂ CX ₁₀ CX ₄ CX ₉ CX ₁₁₋₁₂ CX ₂₂ CX ₁₀₋₁₂ CX ₁₁ CX ₂ C	...
XX	1	157	CX ₂ CX ₁₀ CX ₁₇ CX ₁₀ CX ₂ CX ₉ CX ₂₀ CX ₁₅ CX ₁₀ CX ₂₄ CX ₄ C	...
XXI	1	189	CX ₁₄ CX ₁₅ CX ₄ CX ₂₂ CX ₆₆ CX ₁₂ CX ₂ C	...
XXII	1	145	CX ₁₉ CX ₁₃ CX ₁₂ CX ₈ CX ₁₅ CX ₁₆ CX ₇ CX ₇ CX ₅ C	...
XXIII	2	125 to 136	CX ₁₄ CX ₁₂ CX ₁₃₋₁₄ CX ₁₀₋₁₁ CX ₁₀₋₁₆ CX ₁₃ CX ₈ C	...
XXIV	8	154 to 164	CX ₁₃₋₁₅ CX ₆ CX ₁₂₋₁₄ CX ₂₁₋₂₃ CX ₁₃₋₁₈ CX ₁₂₋₁₉ CX ₁₂₋₁₄ C	...
XXVI	1	131	CX ₁₀ CX ₈ CX ₁₂ CX ₁₃ CX ₉ CX ₂ CX ₈ CX ₁₀ CX ₁₁ CX ₁₄ CX ₁₁ CX ₂ C	...
XXVII	3	140 to 143	CX ₁₅ CX ₁₃ CX ₁₄ CX ₉ CX ₁₈ CX ₁₉ CX ₈ C	...
XXVIII	1	138	CX ₉ CX ₄ CX ₃ CX ₁₇ CX ₈ CX ₄ CX ₈ CX ₁₂ CX ₉ CX ₈ CX ₂ C	...
XXIX	1	188	CX ₂₀ CX ₂₀ CX ₁₃ CX ₁₁ CX ₈ CX ₄₇ CX ₁₀ CX ₁₁ C	...

^a Homology searches were carried out against UNIPROT and *Puccinia* Group Database using blastp (*E* value < 1e-6).

^b Class I has been reported previously by Duplessis and associates (2011a). ... = no hit.

(HMM) scores confirmed positional constraints on the YXC and CX₂₋₃Y motifs and their surrounding sequences in classes I, II, III, and XXIV (discussed below) (Supplementary Fig. S5).

Positive selection in candidate effector genes.

Homology searches were used to refine the sequence clustering of SSP paralogous families and classify them into clusters of

paralogous genes (CPG). We identified a subset of 95 CPG comprising 536 sequences (509 true SSP and 27 larger secreted proteins ranging from 301 to 942 amino acids) that contained three to 39 genes that could be investigated by positive selection analysis (codeml program of the PAML package) (Yang 2007). Eighteen CPG containing a total of 185 genes showed robust evidence of diversifying selection at *P* < 0.05 in both codon sub-

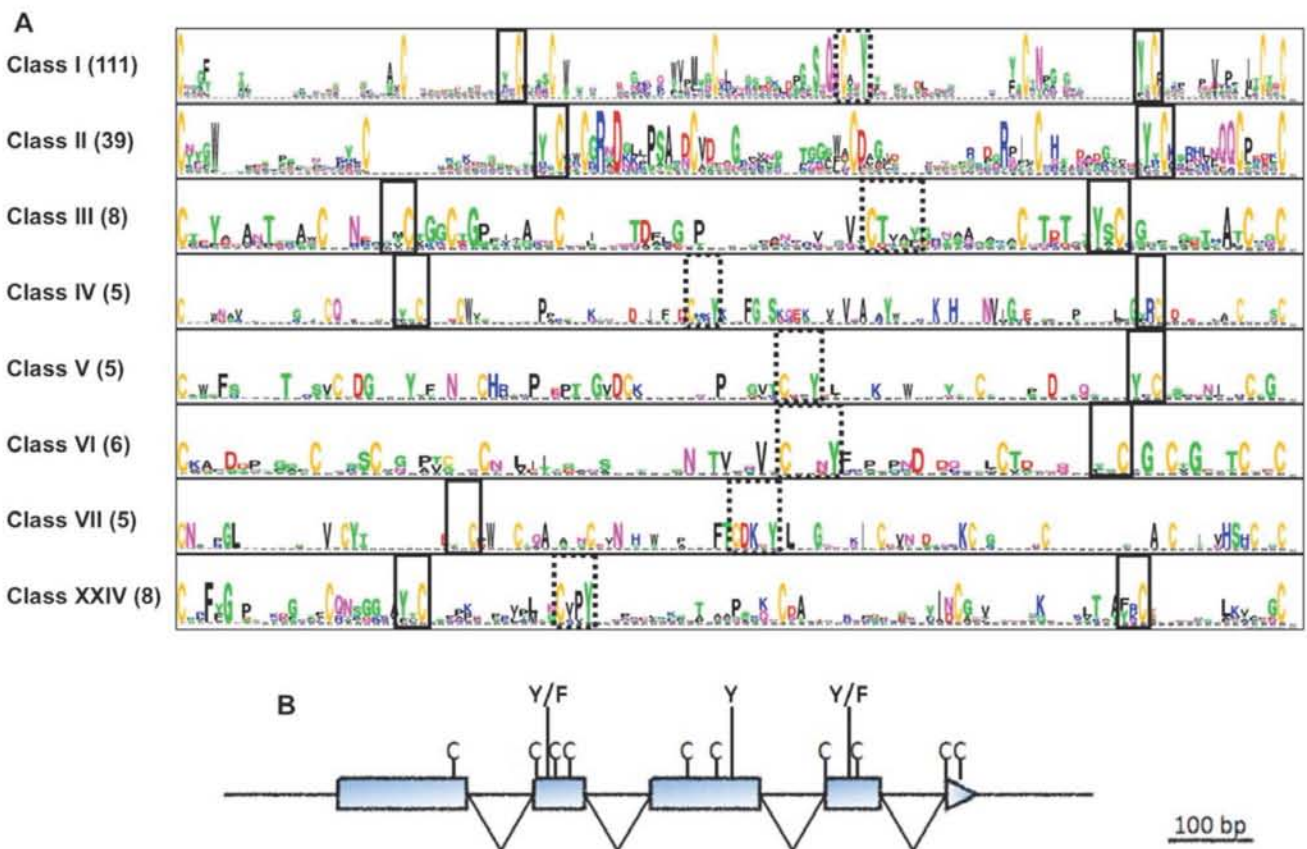


Fig. 2. Conservation profiles and gene structure of the eight largest *Melampsora larici-populina* Cys-rich classes. **A**, Motifs shared by *M. larici-populina* Cys-rich classes. The Y/FXC motif identified in powdery mildew (Godfrey et al. 2010) (solid lines) is present in both the N and C termini (i.e., at the third and eighth conserved Cys, respectively) in six and seven of the eight classes, respectively. Another motif, CX₂₋₃Y (dashed lines), is present in the central part of the protein (i.e., at the sixth conserved Cys) in seven of the eight classes. Conservation profiles were generated with WebLogo. The number of proteins in each class is given in parentheses. Conservation profile of class I as in Duplessis and associates (2011a). **B**, Schematic representation of conserved gene structure in *M. larici-populina* Cys-rich classes. The position of conserved Cys residues is shown, together with the position of Tyr residues found in shared motifs. Introns are represented as “V”s.

Table 3. *Melampsora larici-populina* positively selected clusters of paralogous genes (CPG) encoding small secreted proteins

CPG	Number of genes	Length (amino acids)	Number of Cys residues	Top blast hit ^a
277	6	181 to 185	6 to 7	...
335	7	180 to 187	7 to 9	...
338	13	143 to 194	4 to 10	...
462-1	5	171 to 173	10 to 11	PGTG_17910.2
510-1	16	64 to 86	4 to 6	...
510-2	11	71 to 124	6 to 12	...
517-2	3	133 to 136	8	...
653-1	5	150 to 187	2 to 3	...
1027	3	176 to 185	8 to 9	...
1252	4	117 to 119	0	...
2811	9	75 to 96	6	...
4438	4	168 to 172	6 to 8	...
4890	9	69 to 93	6 to 10	...
5464	13	88 to 105	6 to 9	AvrP4 (<i>M. lini</i>)
Class II	39	133 to 157	9 to 12	...
Class V	5	128 to 149	8 to 9	...
Class XXVII	3	140 to 143	8 to 9	...
H1	30	58 to 84	1 to 6	...

^a Homology searches were carried out against UNIPROT and *Puccinia* Group Database using blastp (*E* value < 1e-6). ... = no hit.

stitution model M2 versus M1 and M8 versus M7 tests, as well as in the M8 versus M8A stringent test of selection (Table 3; Supplementary Table S2). Parameter estimates for each positively selected cluster are shown in Supplementary Table S3. One of these positively selected CPG shows homology to *P. graminis* f. sp. *tritici* (CPG462-1) and one is composed of *M. lini* *AvrP4* homologues (CPG5464). In addition to the *AvrP4* homologues, five other CPG encode very small (<100 amino acids) Cys-rich proteins (CPG510-1, CPG510-2, CPG2811, CPG4890, and CPGH1). Most genes included in the latter families present a conserved LXRR motif (CPG510-1 and CPG510-2) or a region rich in positively charged residues (Arg and Lys) shortly followed by a region rich in acidic residues (Asp and Glu), reminiscent of the RXLR-EER motif from oomycete effectors (Fig. 3; Supplementary Fig. S6). Most genes encoding very small proteins from the CPG under positive selection were absent from the ab initio gene prediction of the *M. larici-populina* genome (72 of 88), exemplifying the importance of expert annotation beyond automated gene prediction. In most of the small Cys-rich secreted proteins with evidence of positive selection, the Cys residues are conserved and the Bayes Empirical Bayes inference of positively selected amino acid sites revealed that codons with highly significant ω values were concentrated in the C-terminal region (Fig. 3).

M. larici-populina candidate effector genes display coordinated expression profiles.

A large proportion of SSP-encoding genes (857 of 1,184) were supported by expressed sequence tags (EST) (Joly et al.

2010; E. Tisserant and S. Duplessis, *unpublished*) or identified as expressed during plant infection using whole-genome oligoarrays (Duplessis et al. 2011b). In order to monitor expression profiles of candidate effectors, 34 SSP-encoding genes displaying homology with previously described rust effectors (Table 1), elevated evolution rates (Fig. 3; Table 3), or contrasted expression levels during plant infection using oligoarrays and EST sequencing were selected for reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis (Supplementary Table S4). Coordinated temporal patterns of SSP transcript expression were observed during poplar leaf infection (Fig. 4; Supplementary Fig. S7). Four selected SSP-encoding genes, including two *RTP1* and one *AvrP4* homologues (protein ID numbers 123932, 123523, and 124272), showed a biphasic expression profile in spores and at late stages of leaf infection (Fig. 4A). Strikingly, four of the eight SSP-encoding genes showing transcript accumulation between 2 and 6 h postinoculation (hpi) (Fig. 4B) encode CFEM (common in the fungal extracellular membrane) domain proteins (protein ID numbers 72734, 114961, 73660, and 58459), including a homologue of *M. lini* HESP-178, suggestive of a possible role at early stages of rust development such as during germ-tube elongation or appressorium formation. Additionally, two genes identified as evolving under positive selection and belonging to CPG class II and CPG1252 (protein ID numbers 123873 and 67604) were both preferentially induced at the fungal penetration stage (6 to 12 hpi). Between 12 and 24 hpi, fungal development is marked by the formation of the first haustoria (Laurans and Pilate 1999). From this point, several SSP transcripts showed a

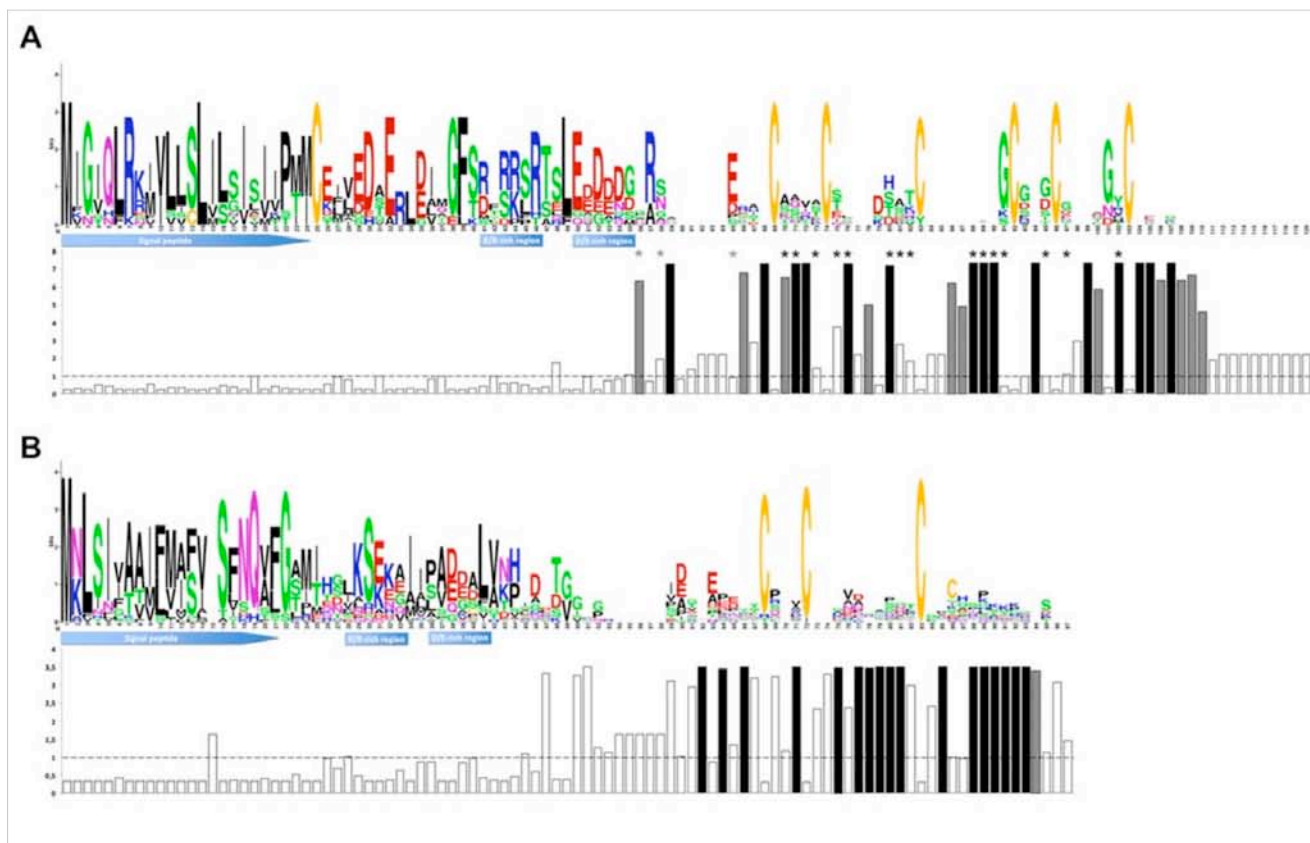


Fig. 3. Examples of positively selected clusters of paralogous genes encoding small secreted proteins. Conservation profiles of *Melampsora larici-populina* clusters of paralogous genes (CPG **A**, CPG5464 (*AvrP4* homologues) and **B**, CPGH1); and associated bar diagram indicating the value of ω calculated with codeml for each codon under site model M2. Predicted signal peptides, as well as stretches of positively charged (K/R) and acidic (D/E) amino acid residues reminiscent of the RXLR-EER translocation signal, are indicated. The dashed line across the bar diagram indicates an ω value of 1; ω values in black indicate the codons that were found to be under significant positive selection; those in gray indicate codons found to be under selection but without significant ω values. Asterisks in A indicate codons found to be under selection by Van der Merwe and associates (2009). Conservation profiles were generated with WebLogo.

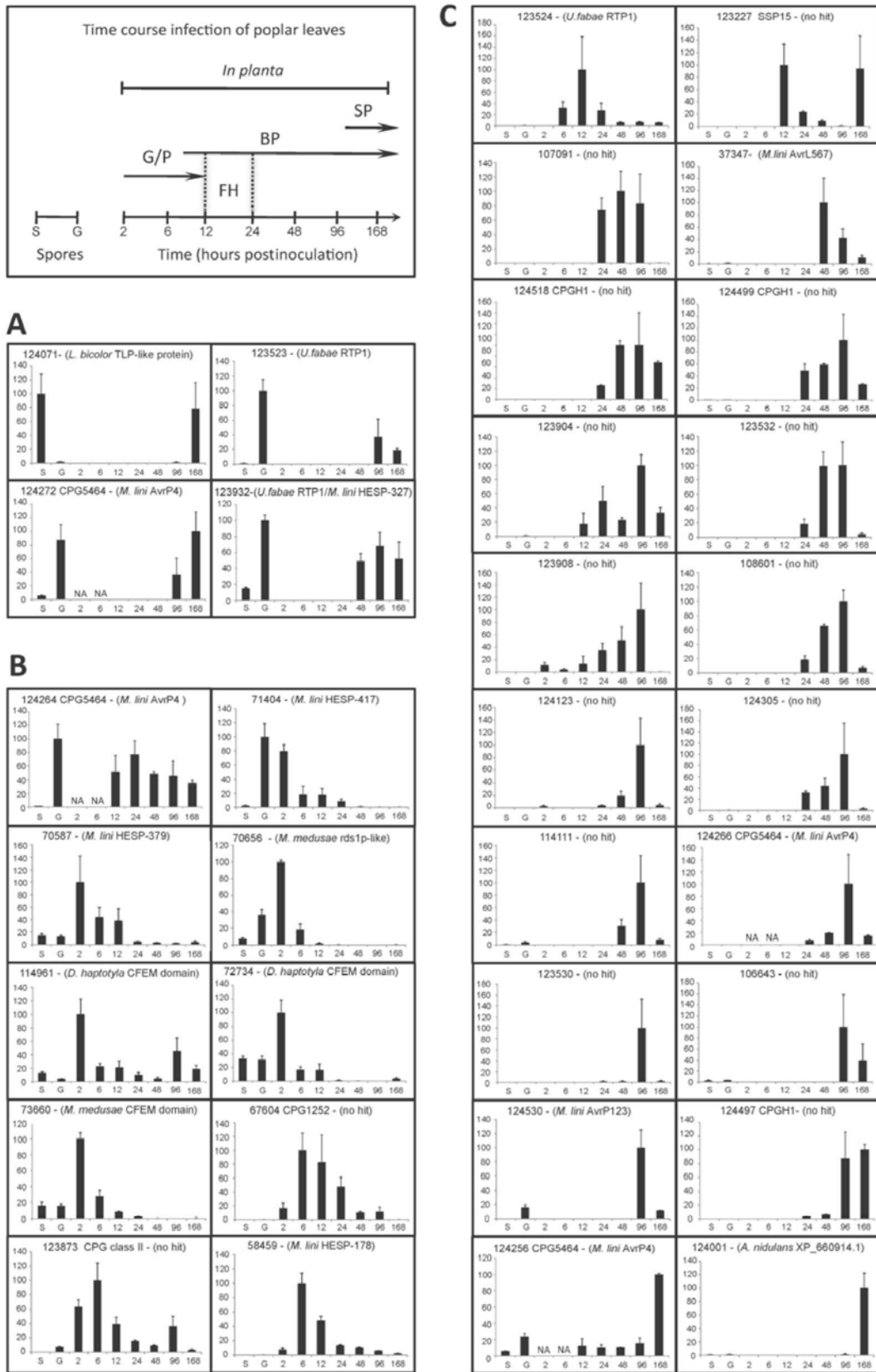


Fig. 4. Expression profiles of *Melampsora larici-populina* small secreted protein (SSP) transcripts during poplar leaf infection. Urediniospores and *M. larici-populina* time-course infection stages on poplar leaves (2 to 168 h postinoculation [hpi]) surveyed in the analysis are detailed in the insert upper-left. S, resting urediniospores; G, germinating urediniospores; G/P, germination/penetration; BP, biotrophic phase; SP, sporulation; FH, first haustoria. Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction expression levels were normalized with *Mlp-aTub* and *Mlp-EIF1 α* reference genes (Hacquard et al. 2011b). For each transcript, expression regulation levels are presented as percentages according to the highest level. **A**, SSP transcripts with biphasic expression profile in spores and during leaf infection. **B**, SSP transcripts with a preferential accumulation in urediniospores (S, G) and during germination or penetration (G/P). **C**, SSP transcripts preferentially accumulated in planta after haustoria formation (BP) or sporulation (SP). NA, not assessed. Error bars represent standard errors.

strong and specific expression associated with biotrophic growth (Fig. 4C). Expression peaks concordant with both early haustoria formation (12 hpi) and sporulation (168 hpi) were detected for a gene encoding an *M. larici-populina*-specific SSP of 15 kDa (protein ID number 123227). The third *Mlp-RTP1* homologue (protein ID number 123524) showed a distinct expression profile compared with its two other relatives in the *Mlp-RTP1* gene family, marked by transcript accumulation concomitant with haustoria formation. Numerous candi-

date effectors preferentially expressed after the differentiation of the first haustoria appeared to be lineage specific or showed homology with characterized avirulence genes (protein ID numbers 37347, 124266, 124256, and 124530). Interestingly, candidate effectors belonging to the fast-evolving CPGH1 (Fig. 3) were also specifically detected in planta after haustoria formation (protein ID numbers 124518, 124499, and 124497).

***M. larici-populina* candidate effectors localize to infection structures.**

Visualization of in planta rust structures was achieved in infected poplar leaves using propidium iodide and Uvitex labeling (Fig. 5). Many infection hyphae and haustoria were observed inside both spongy and palisade mesophyll at 96 hpi during the biotrophic growth phase. The fungal terminal cells differentiated to form haustorial mother cells and developed haustorial necks inside host cells, where the haustorial body extended from the neck and invaginated the plant cell plasmalemma (Fig. 5A). At a later stage of rust infection (i.e., 168 hpi), changes in fungal development were observed with aggregates of sporogenous hyphae and newly formed dikaryotic urediniospores (Fig. 5B). A late time frame of poplar leaf infection (120 to 168 hpi) was chosen for immunological detection of SSP to ensure the presence of important fungal biomass and a diversity of fungal cell types (i.e., infection hyphae, haustorial mother cells, haustoria, sporogenous hyphae, and newly formed urediniospores). *M. larici-populina* candidate effectors *Mlp-AvrL567*, *Mlp-RTP1sc31* (located on scaffold 31), *Mlp-HESP-327/RTP1*, and *Mlp-SSP15* (protein ID numbers 37347, 123523, 123932, and 123227, respectively) were assayed for localization in infected poplar leaves by immunofluorescence microscopy and revealed distinct labeling patterns (Fig. 5). Strong labeling of *Mlp-RTP1sc31* was observed at the periphery of infection hyphae colonizing the plant mesophyll (Fig. 5C and 5D; Supplementary Fig. S8) whereas no labeling was observed for haustoria or other fungal structures. In contrast, the *Mlp-HESP-327/RTP1* fusion protein was immunolocalized at the periphery of haustoria (Fig. 5E) and infection hyphae (Fig. 5F; Supplementary Fig. S9). Specific labeling of *Mlp-AvrL567* was detected at the periphery of haustoria (Fig. 5G and H). This SSP likely resides in the extrahaustorial matrix and was also detected around the haustorial neck (Fig. 5H) whereas no fluorescence was detected in haustorial mother cells, infection and sporogenous hyphae, or newly formed urediniospores, indicating a localization restricted to haustoria. Moreover, *Mlp-AvrL567* was also detected at the periphery of haustoria at 48 hpi (Supplementary Fig. S10), which correlates with the peak of transcript expression observed by RT-qPCR (Fig. 4). As observed for the *Mlp-HESP-327/RTP1* fusion protein, *Mlp-SSP15* can localize in multiple rust cell types. *Mlp-SSP15*

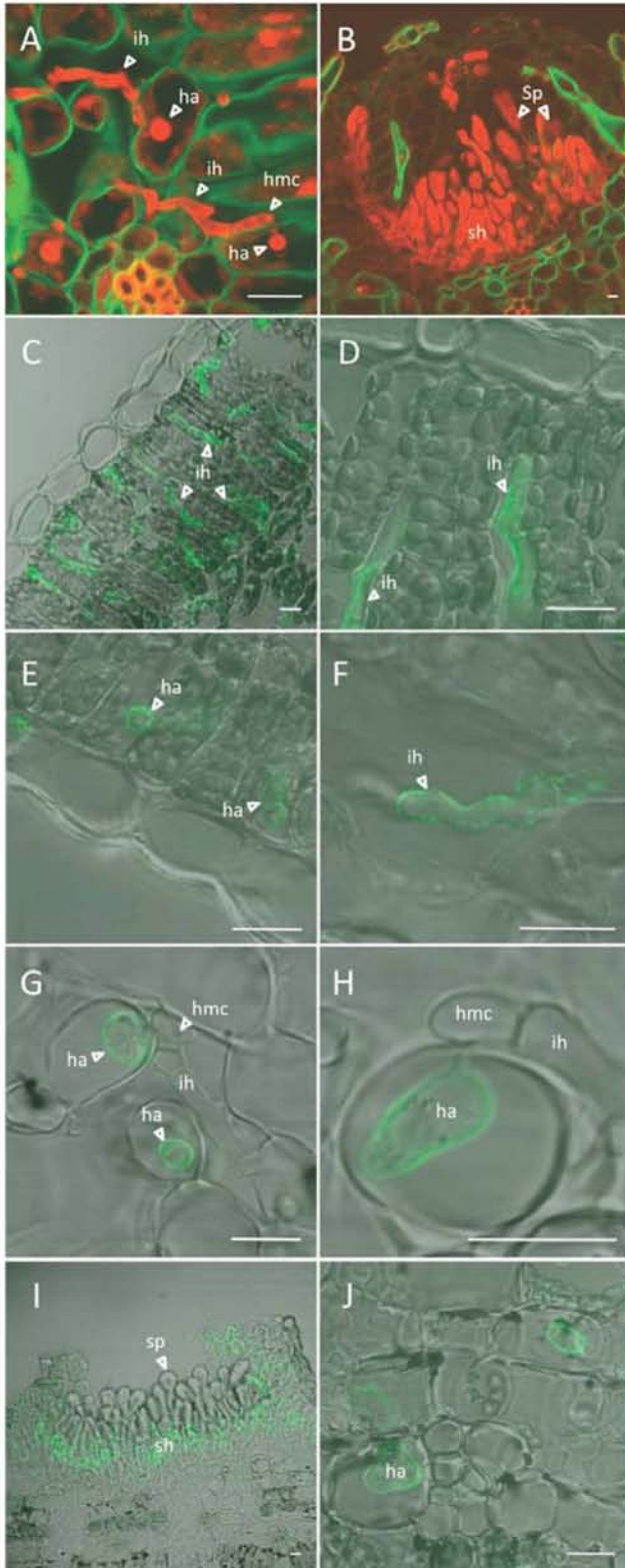


Fig. 5. Localization of *Melampsora larici-populina* candidate effectors during poplar leaf infection. **A** and **B**, Confocal laser-scanning microscopy images showing in planta fungal structures using Uvitex 2B (green) and propidium iodide (red) to label fungal–plant cell wall and fungal cells, respectively. **A**, Infection hyphae and haustoria colonizing mesophyll at 96 h postinoculation (hpi) and **B**, uredinium formed after 168 hpi. **C** to **J**, Immunofluorescence localization of rust candidate effectors at late stage of rust infection. Merged-immunofluorescence and phase contrast images are presented. **C** and **D**, Immunolabeling of *Mlp-RTP1sc31* around infection hyphae at 120 hpi; **E** and **F**, labeling of *Mlp-HESP-327/RTP1* around haustoria and infection hyphae at 120 hpi; **G** and **H**, *Mlp-AvrL567* labeling around haustoria at 168 hpi; **I** and **J**, immunolabeling of *Mlp-SSP15* in sporogenous hyphae and around haustoria at 168 hpi. Abbreviations: ih, infection hyphae; ha, haustorium; hmc, haustorial mother cell; sh, sporogenous hyphae; sp, urediniospores. Pictures were taken using a ×100 objective and scale bars represent 5 μm.

showed a very strong labeling at the periphery of the basal sporogenous hyphae in uredinia (Fig. 5I; Supplementary Fig. S11) whereas the newly formed urediniospores remained exempt of any signal. Interestingly, a labeling was also observed at the periphery of haustoria but not in infection hyphae (Fig. 5J) in the mesophyll, suggesting an accumulation of the protein at the interface between fungal haustoria and infected host cells. For each immunological detection, controls with preimmune serum did not show labeling of rust infected tissue.

DISCUSSION

Sequencing genomes of pathogens provides an invaluable resource for biologists, and successful mining of sequenced genomes is a key to new research avenues. Here, we have used the data from the *M. larici-populina* genome to analyze, in detail, the 1,184 genes encoding SSP (Duplessis et al. 2011a). In order to identify candidate effectors from these secreted proteins, we designed a multifaceted approach based on gene family annotation, screening for positive selection, expression profiling, and protein immunolocalization in the pathosystem.

Duplessis and colleagues (2011a) described the largest SSP-encoding gene family in *M. larici-populina* as Cys-rich proteins with a conserved gene structure and short amino acid motifs. Annotation of other Cys-rich SSP classes revealed that a total of 228 genes shared this common gene structure as well as YXC and CX₂₋₃Y motifs for many of them. We show that these motifs occur at higher frequencies at specific positions in the eight largest Cys-rich classes. Even though blastp or tblastn analyses did not reveal sequence similarities between these classes, the conservation of a particular gene structure, including given amino acid residues at particular positions, suggests that these classes arose from a single ancestor. Some Cys-rich classes harboring YXC motifs were found to be expressed in haustoria and two classes were homologous to HESP from the flax rust fungus, *M. lini*. Recently, a new class of candidate effectors with a similar motif (Y/F/WXC) was identified in the barley powdery mildew, *B. graminis* f. sp. *hordei*, as well as in two cereal rusts, *P. graminis* f. sp. *tritici* and *Puccinia triticina* (Godfrey et al. 2010). The presence of this motif was confirmed in the secretome of *P. graminis* f. sp. *tritici* by genome-wide analysis (Duplessis et al. 2011a). Consistent with our observation in *M. larici-populina*, overall sequence identity was low and these proteins had a highly similar exon-intron structure. The in-depth analysis of *M. larici-populina* Cys-rich SSP classes strengthens previous observations (Duplessis et al. 2011a), indicating that YXC motifs are not restricted to the N-terminal region of these proteins, contrary to *B. graminis* (Godfrey et al. 2010), and that several YXC motifs can be detected. Moreover, other motifs can be present in Cys-rich SSP, such as the CX₂₋₃Y motif found in many of the YXC-containing SSP. In the barley powdery mildew, putative effectors containing Y/F/WXC motifs were highly expressed in haustoria, suggesting that such secreted proteins could serve effector functions (Godfrey et al. 2010; Spanu et al. 2010).

In many plant pathogens, secreted proteins show accelerated evolutionary rates, consistent with the model of an “arms race” between the plant immune system and the secreted effectors of these pathogens (Dodds and Rathjen 2010; Terauchi and Yoshida 2010). Using a comparative genomic approach on EST data, Joly and associates (2010) reported accelerated evolution of genes encoding secreted proteins from four *Melampsora* spp. Although they identified positively selected genes encoding Cys-rich secreted proteins with no close homologue outside of the genus, their study focused mostly on orthologous genes expressed at the surface of poplar leaves (mostly in urediniospores, germ tubes, appressoria, and uredinia). Most

positively selected *M. larici-populina* SSP-encoding paralogous families identified in the present study were also lineage specific and Cys rich but the majority were expressed in planta, suggesting possible interactions with host factors. Cys-rich proteins are common in effectors of fungal pathogens in which disulfide bridges could enhance stability in the plant apoplast (Stergiopoulos and de Wit 2009). Thus, uncovering such a large content of Cys-rich proteins in the genome of the poplar rust fungus was not surprising and strengthens this general feature (Duplessis et al. 2011a). Rather than providing resistance to apoplastic proteases, the presence of disulfide bonds in secreted proteins could be important for their structure and function (Kamoun 2006; Stergiopoulos and de Wit 2009). In several *M. larici-populina* SSP families under positive selection, Cys patterns were conserved despite low sequence identity. Although Cys patterns probably form the network of disulfide bridges necessary for the maintenance of the protein structure, variable regions could provide the sequences required for the specific function of the proteins. In such cases, significant changes in amino acid sequences (except at the Cys residues) could occur without altering the overall fold topology, making Cys-rich SSP ideal for performing roles in recognition and specificity (Povolotskaya and Kondrashov 2010; Templeton et al. 1994). Thus, a high content in Cys residues could play a disproportionately important role in the evolution of virulence effectors, leading to a very rapid diversification and contributing to the emergence of new virulences.

In this study, 18 of 95 CPG showed robust evidence of diversifying selection, supporting the assumption that paralogous gene expansions often form the substrate for adaptive change. Selection events often result in an increased gene number in the pathogen to promote virulence while, on the other side, the need to evade host recognition by R proteins continues to expand (Jiang et al. 2008). In such cases, rapid sequence divergence in newly formed effector paralogs allows the number of effector genes in the pathogen to increase while minimizing the likelihood of host recognition (Jiang et al. 2008). In most of the small Cys-rich secreted proteins with evidence of positive selection, codons with highly significant ω values were concentrated in the C-terminal region, suggesting that this region interacts with host components, and that this interaction drives the diversification of the gene family. In rust and oomycete pathogens, diversifying selection was demonstrated as being confined to the C-terminal region in many effector gene families (Allen et al. 2004; Barrett et al. 2009; Rehmany et al. 2005; Van der Merwe et al. 2009; Win et al. 2007). These findings are consistent with the view that effectors are modular proteins, with the N terminus involved in secretion and host translocation and the C-terminal domain dedicated to modulating or interacting with host defenses inside plant cells (Schornack et al. 2009; Win et al. 2007).

Many oomycete effectors harbor the bipartite RXLR-EER amino acid motif that is dispensable for exocytosis but required for plant access (Dou et al. 2008; Whisson et al. 2007). The RXLR motif appears to mediate entry of effectors into host cells independently of any pathogen-derived machinery (Dou et al. 2008). Some fungal effectors can also enter plant cells in the absence of the pathogen and, although they lack an RXLR domain and do not share obvious conserved peptide motifs, sequences loosely related to the RXLR motif are often found (Catanzariti et al. 2006; Kale et al. 2010; Manning and Ciuffetti 2005; Rafiqi et al. 2010). Some positively selected CPG encoding different families of small Cys-rich SSP were shown to possess various N-terminal motifs reminiscent of the RXLR-EER translocation signal, and several of these SSP-encoding genes were specifically expressed in planta. The RXLR motif is overrepresented and positionally constrained in the

secretome of *Phytophthora* and *Hyaloperonospora* spp. relative to other eukaryotes, which seems to be the result of the RXLR effector reservoir being dominated by a single highly successful and rapidly evolving superfamily (Jiang et al. 2008; Win et al. 2007). A systematic search to uncover such overrepresented motifs in other eukaryotes has revealed the overrepresentation of LXRR in *Puccinia* spp.-secreted proteins (E. Kemen and J. D. G. Jones, *personal communication*), and our data suggest that this motif is also represented in *M. larici-populina* candidate effectors.

In several plant–microbe interactions such as *Magnaporthe oryzae*–rice (Mosquera et al. 2009), *Ustilago maydis*–maize (Kämper et al. 2006), *B. graminis*–barley (Spanu et al. 2010), and *Laccaria bicolor*–poplar (Martin et al. 2008; Plett et al. 2011), secretome prediction along with transcript profiling led to the identification of candidate fungal effectors specifically expressed during colonization of plant tissues. Transcript profiling of *M. larici-populina* during time-course infection of poplar leaves revealed temporal and tissue-specific expression of fungal SSP (Duplessis et al. 2011b). This finding was corroborated in the present study by RT-qPCR for 34 selected SSP. This result highlights the intricate processes of cellular control developed by plant pathogens during host colonization through delivery of signal molecules. Most of the SSP transcripts assessed in the present study showed specific accumulation during or after haustoria formation and several encode homologues of rust effectors such as *U. fabae* RTP1 (Kemen et al. 2005) and *M. lini* avirulence factors (Dodds et al. 2004; Ellis et al. 2009). Interestingly, several SSP transcripts induced at 96 hpi in planta showed lower expression levels at 168 hpi. These results are consistent with the transcriptional switch observed at the uredinial stage of *M. larici-populina* between biotrophy- and sporulation-related areas isolated using laser-capture microdissection (Hacquard et al. 2010). The panel of tested genes included seven members of CPGH1 and CPG5464 (*M. lini* AvrP4 homologues) that were not predicted in the automatic annotation of the poplar rust genome and that were not represented on the *M. larici-populina* custom oligoarray. RT-qPCR profiles obtained with specific primers validated their expression during host infection, and showed distinct expression profiles within the same gene family, as previously shown for homologues of *M. lini* HESP-417 in *M. larici-populina* (Duplessis et al. 2011b). Thus, the gene diversity among CPG assessed by positive selection analyses seems to be mirrored in the diversity of expression profiles observed by RT-qPCR during infection. Because our study specifically focused on the infection of the telial host (i.e., poplar leaves), it remains to be determined to what extent these SSP-encoding genes might also be expressed during infection of larch needles, the aecial host.

To manipulate host cell functions, many effector proteins target host cell components during plant tissue invasion (Dodds et al. 2009). In *M. larici-populina*, several putative rust effectors immunolocalize at the periphery of haustorial structures during colonization of poplar leaves. For many fungal effectors, translocation inside host cell has been hypothesized because most Avr proteins are recognized by cytoplasmic R proteins (Dodds et al. 2006; Houterman et al. 2009). Only a few examples reported direct evidence of effector translocation inside the plant cell (Kemen et al. 2005; Khang et al. 2010; Plett et al. 2011; Rafiqi et al. 2010) or into the plant apoplast (Doehlemann et al. 2009). In rust fungi, immunolocalization of RTP1 from *U. fabae* and AvrM from *M. lini* showed effector accumulation in the extrahaustorial matrix but also inside the plant cell, suggesting that haustorial structure might be involved in effector secretion (Kemen et al. 2005; Rafiqi et al. 2010). Interestingly, accumulation of SSP (*Mlp*-HESP-327/RTP1, *Mlp*-AvrL567, and *Mlp*-SSP15) was observed at the periphery of

M. larici-populina haustorial structure. The absence of labeling inside the host cell does not seem to support protein internalization. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that a low quantity of fungal effector could be released inside host cells at undetectable levels by immunodetection (Rafiqi et al. 2010) or that their delivery into host cells is temporally regulated. The candidate effectors *Mlp*-SSP15 and *Mlp*-HESP-327/RTP1 displayed localization in different fungal cell types. Such a localization at distinct sites was previously shown for *M. lini* AvrM, which was detected both at hyphal tips and in haustoria during flax infection (Rafiqi et al. 2010). In spite of the cytoplasmic and nuclear localization reported for *U. fabae* RTP1 (Kemen et al. 2005), the localization of *Mlp*-HESP-327/RTP1 was restricted to the periphery of haustoria and infection hyphae and was not detected inside plant cells. During flax–flax rust interaction, intracellular recognition between AvrL567 and the cognate resistance genes suggests effector translocation from haustoria toward infected host cell (Dodds et al. 2004, 2006). *M. lini* AvrL567 uptake in the cytoplasm of plant cells is dependent on an N-terminal region (amino acid position between 26 and 50) that contains an RFYR motif reminiscent of the RXLR motif found in oomycete effectors (Kale et al. 2010; Rafiqi et al. 2010). *M. lini* and *M. larici-populina* AvrL567 homologues show secondary structure similarities; however, the RFYR motif is not conserved and the 26- to 50-amino acid region shows poor similarity. Beside, *Mlp*-AvrL567 displayed a specific localization at the periphery of haustoria and was not detected in the host cytoplasm, consistent with an accumulation in the extrahaustorial matrix. By sequencing *Mlp*-AvrL567 alleles in 32 poplar rust isolates of known pathotypes, we were not able to detect either extensive polymorphism or any signatures of diversifying selection, contrasting with the positive selection identified in *M. lini* AvrL567 (Dodds et al. 2006). The striking differences between *M. lini* and *M. larici-populina* AvrL567 homologues might illustrate the specific evolution of the effector arsenal within the *Melampsora* genus.

The recent analysis of the genome sequence of the poplar leaf rust fungus *M. larici-populina* paved the way for detailed investigations of gene families related to biotrophic lifestyle and pathogenicity (Duplessis et al. 2011a). In this study, we presented a detailed analysis of the 1,184 SSP in *M. larici-populina*. Genome-wide patterns of SSP expression and variation helped to describe a large reservoir of candidate effectors in the poplar rust fungus. Hopefully, the genetic transformation system developed for *U. fabae* (Djelic et al. 2011) should help to validate the function of these candidates in the poplar–poplar rust pathosystem. A better understanding of effectors' evolution will allow the rational design of experiments to assess functions of positively evolving gene families. Globally, effector identification in rust pathogens and their functional characterization should facilitate the comprehension of obligate biotrophy. Information regarding the function of *M. larici-populina* effectors, combined with accurate data on the *Populus* immune system, will be crucial for elucidating mechanisms underlying processes such as virulence and ETI and is likely to lead to new breeding strategies. More rust genomes are currently being sequenced (Broad Institute and Joint Genome Institute), which will clearly enhance our capacity to discern patterns in related effector repertoires.

MATERIALS AND METHODS

Genomic resources.

Genome sequence data of the *M. larici-populina* 98AG31 (i.e., sequences of assembled scaffolds, sets of predicted genes and deduced protein sequences, and EST) were downloaded

from the Joint Genome Institute and additional sequence data (i.e., in planta *M. larici-populina* EST, basidiomycete genomic data for comparative analyses) were available to the *Melamp-sora* Genome Consortium at the MycorWeb website. Comparisons to the *P. graminis* f. sp. *tritici* genome sequence and nucleic or proteic datasets were performed through the Puccinia Group database webportal at the Broad Institute.

Sequence analysis.

In silico predictions of secreted proteins were carried out using combinations of SignalP 3.0, TargetP 1.1, and TMHMM 2.0 (Emanuelsson et al. 2007) as previously reported by Duplessis and associates (2011a), based on different criteria for SignalP-HMM Sprob score, SignalP-NN Smax and D scores, and TargetP signal peptide prediction (Klee and Ellis 2005), and SSP were selected based on an arbitrary cut-off of 300 amino acids (Duplessis et al. 2011a). Similarity searches for full-length sequences and conserved domains were performed using a combination of standard bioinformatics programs and customized Python scripts, the main search program being BLAST (Altschul et al. 1997). Multiple alignments were conducted using the programs ClustalW (Thompson et al. 1994) and MUSCLE (Edgar 2004) and adjusted manually. Sequence alignments were submitted to the WebLogo server to generate graphical consensus displays. Phylogenetic analyses of the AvrP4 family was performed using Bayesian inference and Markov chain Monte Carlo simulations (B/MCMC) implemented in MrBayes version 3.0 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). The models for nucleotide substitutions were selected prior to the MCMC using the likelihood ratio test implemented in the Modeltest 3.7 program (Posada and Crandall 1998). One cold and seven incrementally heated chains were run for one million generations, with a random starting tree. Trees were sampled every 100 generations, giving 10,000 trees, and the first 10% of the trees (burn-in period set to 1,000) were excluded to compute the majority rule consensus tree of posterior probabilities.

Sequence randomization analysis.

The conservation of the YXC and CX₂₋₃Y motifs in each Cys-rich SSP class was assessed by permutating amino acids in SSP using two type of sequence randomization. In a first test, after removal of predicted secretory leader, SSP sequences were randomly shuffled 1,000 times. Positions of YXC and CX₂₋₃Y motifs in each class (true SSP class and permuted SSP set) were detected by the FUZZPRO program in the EMBOSS package. A permutation test was applied to determine whether the observed occurrences of YXC and CX₂₋₃Y motifs in the different classes happened by chance. Using the reshuffled sequences with the same amino acid composition as the real proteins, the observed motif frequencies per class were compared with the expected values based on 1,000 interactions. The expected motif occurrences reflecting the null model of motif conservation were used to determine a *P* value for motif constraint. Based on the conservation profiles, the third and eighth Cys residues with the surrounding peptides always compose the YXC motif (except class II) and the sixth Cys residue composes the CX₂₋₃Y motif. To further confirm the importance of the conserved Cys residues, protein sequences of five amino acids upstream and downstream of the motifs were defined as core regions. Therefore, classes I, III, and XXIV have three core regions and class II has two core regions. For example, the conserved Cys position in the YXC motif was always kept at position eight of the core region (X₇CX₅) and the sixth position in the CX₂₋₃Y motif core region was always Cys (X₅CX₇₋₈). Peptides in the core region of each SSP classes were extracted to build the HMM (Eddy 1998).

The significance of the Cys and surrounding residues were measured by the aligned HMM score. Peptides in the core region were randomly shuffled 1,000 times whereas the Cys position was fixed, and the frequencies of the HMM scores between the original core peptides and the randomized core peptides were compared.

Positive selection analyses.

M. larici-populina multigene families were generated by Tribe-MCL (Duplessis et al. 2011a) and enlarged using recursive tblastn searches (*E* value < 1e-6). Using this approach, 536 *M. larici-populina* genes encoding secreted proteins were grouped into CPG that contained a minimum of three sequences. CPG were manually edited to remove either poorly aligned regions (e.g., large indels) or sequences for which similarity was not found throughout the majority of the coding sequence (i.e., less than 50%). The resulting 95 CPG were then submitted to positive selection analyses using a suite of programs regrouped in a single Python script, as previously described (Joly et al. 2010).

Plant material and fungal inoculation procedure.

Plant infection experiments were performed using strain 98AG31 (pathotype 3-4-7) of *M. larici-populina* on *Populus trichocarpa* × *P. deltoides* 'Beaupré' leaves (compatible interaction). Urediniospores of *M. larici-populina* were propagated on detached leaves of susceptible *P. deltoides* × *P. nigra* 'Robusta' as previously reported (Rinaldi et al. 2007). Germlings were obtained from 1 mg of urediniospores grown on water agar medium (2%) in petri dishes for 3 h at 19 ± 1°C. Plant inoculation procedures were performed as previously described using the same inoculum dose of 100,000 urediniospores/ml and strictly identical culture conditions (Rinaldi et al. 2007). The samples harvested at different time points were immediately fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde for microscopy analyses or snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for further nucleic acid isolation.

RNA isolation.

Isolation of total RNA was performed with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) from 1 mg of resting and germinated spores, and from 100 mg of infected leaf tissues during the compatible interaction (2 to 168 hpi), including a DNase I (Qiagen) treatment, according to the manufacturer's instructions to eliminate traces of genomic DNA. Electrophoretic RNA profiles were assessed with an Experion analyzer using the Experion RNA Standard-sens analysis kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Expression profiling during time-course infection.

Expression profiling of 34 SSP-encoding genes was monitored by RT-qPCR and using *M. larici-populina* custom oligo-arrays as previously described (Duplessis et al. 2011b; Hacquard et al. 2010, 2011b). For RT-qPCR, specific primers amplifying fragments ranging from 84 to 307 nucleotides were designed with the Primer 3 and Amplify 3X programs. Specific primers for genes encoding protein ID numbers 58459, 70587, 70656, 71404, and 123524 were previously described (Hacquard et al. 2010). Homology searches against the *M. larici-populina* and *P. trichocarpa* genome sequences were performed using the blastn algorithm to verify absence of cross annealing with other *M. larici-populina* transcripts as well as with host plant transcripts. First-strand cDNA synthesis and PCR amplifications were performed as previously described (Duplessis et al. 2011b; Hacquard et al. 2010, 2011b). Expression of the *M. larici-populina* candidate genes was determined using the 2^{-ΔCt} calculation and calibrated to the highest level of expression ob-

served (Livak and Schmittgen 2001). *M. larici-populina* transcript levels were normalized with α -tubulin (*Mlp-aTUB*) and elongation factor (*Mlp-ELF1 α*) (Hacquard et al. 2011b). Time-course expression data obtained with *M. larici-populina* custom oligoarrays (Duplessis et al. 2011b) are available under the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus accession GSE21624.

Laser-scanning confocal microscopy.

Fungal structures were visualized in infected leaves at 96 and 168 hpi. Leaves were cut and fixed for 3 h at 4°C in 4% (wt/vol) paraformaldehyde prepared in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7, embedded in 6% agarose (wt/vol), and cut into 15- and 20- μ m sections using a vibratome VT1000S (Leica, Nanterre, France). Propidium iodide and Uvitex staining were performed on 20- μ m sections as previously described (Hacquard et al. 2010). For indirect immunofluorescent localization, peptides were synthesized for *Mlp-AvrL567*, *Mlp-SSP15*, *Mlp-RTP1sc31*, and *Mlp-HESP-327/RTP1* and were used as antigen for the generation of antibodies in rabbits according to the manufacturer's procedure (Eurogentec, Seraing, Belgium). The anti-*Mlp-AvrL567*, anti-*Mlp-SSP15*, anti-*Mlp-RTP1sc31*, and anti-*Mlp-HESP-327/RTP1* immunoglobulin G (IgG) fractions as well as preimmune sera were purified and desalted using the MabTrap kit (GE Healthcare, Orsay, France) according to the manufacturer's recommendations. Transversal sections of 15 μ m from infected leaves of Beaupré poplar were fixed and embedded in agarose as described above. Immunolocalization was performed essentially as previously described (Martin et al. 2008), with the following modifications. Sections were digested for 10 min in PBS buffer supplemented with 0.1% (wt/vol) cellulase, 0.01% (wt/vol) pectolyase, and 0.1% (wt/vol) bovine serum albumen (BSA). After digestion, sections were washed five times for 5 min each with PBS buffer and then incubated in PBS containing 1% (wt/vol) BSA. The BSA was removed and the sections were incubated overnight at 4°C with purified anti-*Mlp-AvrL567* IgG, anti-*Mlp-SSP15* IgG, anti-*Mlp-RTP1sc31* IgG, or anti-*Mlp-HESP-327/RTP1* IgG at a final concentration of 0.034, 0.023, 0.022, and 0.022 mg/ml, respectively, in PBS buffer with 1% BSA (wt/vol). Sections were incubated with IgG purified from preimmune sera at the same concentrations for control observation. After five PBS washes, sections were incubated in PBS containing the goat anti-rabbit IgG Alexa fluor 488 conjugate (1:400) used as secondary antibody (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). After five more PBS washes, sections were mounted in antifade reagent (Molecular Probes) and observed with a Radiance 2100 AGR3Q-BLD Rainbow microscope (Bio-Rad) using X60 and X100 objectives.

Mlp-AvrL567 polymorphism analysis.

In all, 32 dikaryotic *M. larici-populina* isolates displaying various combinations of virulences were selected in a collection available at INRA Nancy (Barrès et al. 2006). DNA was isolated using the DNeasy plant mini kit (Qiagen). *AvrL567* alleles were amplified with specific primers (5'-ATGAAGATTC ATCTATCATTGAAAGCC and 3'-TCACCACTTCTTGGGT TTGGTA) defined after JGI protein ID number 37347. Amplified fragments were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and directly sequenced according to GenomeLab Dye terminator cycle sequencing with Quick Start kit (Beckman Coulter, Villepinte, France). For isolates showing allele polymorphism at the *AvrL567* locus, amplicons were purified and cloned in pCR 4-TOPO using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Plasmidic DNA was isolated with the GeneJet plasmid miniprep kit (Fermentas Life Science, St. Rémy Les Chevreuse, France) and *AvrL567* alleles were se-

quenced as mentioned above using pCR 4-TOPO M13 5' and 3' primers.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the INRA and the Région Lorraine council to S. Duplessis and F. Martin, from Natural Resources Canada to R. Hamelin, and from IUAP P6/25 (BioMaGNet) to P. Rouzé and Y. Van de Peer. We thank the Joint Genome Institute (JGI) for allowing early access to the *M. larici-populina* genome sequence. JGI sequencing is supported by the Office of Science of the United States Department of Energy under contract number DE-AC02-05CH11231. We thank E. Morin at INRA Nancy (France) for bioinformatic support and K. Vandepoele at Ghent University (Belgium) for biostatistic support. S. Hacquard, D. L. Joly, F. Martin, R. C. Hamelin, and S. Duplessis conceived and designed the experiments; S. Hacquard, D. L. Joly, E. Tisserant, Y.-C. Lin, N. Feau, B. Petre, C. Delaruelle, and P. Tanguy performed the experiments; S. Hacquard, D. L. Joly, Y.-C. Lin, and S. Duplessis analyzed the data; V. Legué, A. Kohler, P. Frey, Y. Van de Peer, and P. Rouzé contributed reagents, materials, or analysis tools; and S. Hacquard, D. L. Joly, Y.-C. Lin, B. Petre, N. Feau, and S. Duplessis wrote the article.

LITERATURE CITED

- Allen, R. L., Bittner-Eddy, P. D., Grenville-Briggs, L. J., Meitz, J. C., Rehmany, A. P., Rose, L. E., and Beynon, J. L. 2004. Host-parasite co-evolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* 306:1957-1960.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Barrès, B., Dutect, C., Andrieux, A., Caron, H., Pinon, J., and Frey, P. 2006. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*, and cross-amplification in related species. *Mol. Ecol. Notes* 6:60-64.
- Barrett, L. G., Thrall, P. H., Dodds, P. N., van der Merwe, M., Linde, C. C., Lawrence, G. J., and Burdon, J. J. 2009. Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*. *Mol. Biol. Evol.* 26:2499-2513.
- Baxter, L., Tripathy, S., Ishaque, N., Boot, N., Cabral, A., Kemen, E., Thines, M., Ah-Fong, A., Anderson, R., Badejoko, W., Bittner-Eddy, P., Boore, J. L., Chibucos, M. C., Coates, M., Dehal, P., Delehaunty, K., Dong, S., Downtown, P., Dumas, B., Fabro, G., Fronick, C., Fuerstenberg, S. I., Fulton, L., Gaulin, E., Govers, F., Hughes, L., Humphray, S., Jiang, R. H. Y., Judelson, H., Kamoun, S., Kyung, K., Meijer, H., Minx, P., Morris, P., Nelson, J., Phuntumart, V., Qutob, D., Rehmany, A., Rougon-Cardoso, A., Ryden, P., Torto-Alalibo, T., Studholme, D., Wang, Y., Win, J., Wood, J., Clifton, S. W., Rogers, J., Van den Ackerveken, G., Jones, J. D. G., McDowell, J. M., Beynon, J., and Tyler, B. M. 2010. Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome. *Science* 330:1549-1551.
- Bolton, M. D., Van Esse, H. P., Vossen, J. H., De Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I. J. E., Van Den Berg, G. C. M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H. L., De Koster, C. G., De Wit, P. J. G. M., Joosten, M. H. A. J., and Thomma, B. P. H. J. 2008. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol. Microbiol.* 69:119-136.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., and Kahmann, R. 2009. *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:423-445.
- Brunner, P. C., Keller, N., and McDonald, B. A. 2009. Wheat domestication accelerated evolution and triggered positive selection in the β -xylosidase enzyme of *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 4:e7884. Published online.
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. 2006. Haustorially-expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18:243-256.
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, T., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. A. J., and Thomma, B. P. H. J. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329:953-955.
- Djelic, A., Schmid, A., Lenz, H., Sharma, P., Koch, C., Wirsle, S. G. R., and Voegelé, R. T. 2011. Transient transformation of the obligate biotrophic rust fungus *Uromyces fabae* using biolistics. *Fungal Biol.* 115:633-642.
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. 2010. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11:539-548.

- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. 2004. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16:755-768.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I. A., Ayliffe, M. A., Kobe, B., and Ellis, J. G. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:8888-8893.
- Dodds, P. N., Rafiqi, M., Gan, P. H. P., Hardham, A. R., Jones, D. A., and Ellis, J. G. 2009. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: Pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol.* 183:993-1000.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwambach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., and Kahman, R. 2009. Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.* 5:e1000290. Published online.
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Jiang, R. H. Y., Bruce, N. A., Arredondo, F. D., Zhang, X., and Tyler, B. M. 2008. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* 20:1930-1947.
- Duplessis, S., Major, I., Martin, F., and Séguin, A. 2009. Poplar and pathogen interactions: Insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28:309-334.
- Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y. C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B., Chiu, R., Coutinho, P., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M., Kodira, C., Kohler, A., Hües, U., Lindquist, E. A., Lucas, S., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J. L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G.A., Henrissat, B., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Schein, J. E., Zhong, S., Hamelin, R. C., Grigoriev, I. V., Szabo, L. J., and Martin, F. 2011a. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:9166-9171.
- Duplessis, S., Hacquard, S., Delaruelle, C., Tisserant, E., Frey, P., Martin, F., and Kohler, A. 2011b. *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:808-818.
- Eddy, S.R. 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14:755-763.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792-1797.
- Ellis, J. G., and Dodds, P. N. 2011. Showdown at the RXLR motif: Serious differences of opinion in how effector proteins from filamentous eukaryotic pathogens enter plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:14381-14382.
- Ellis, J. G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A., and Dodds, P. N. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:399-405.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Prot.* 2:953-971.
- Feau, N., Joly, D. L., and Hamelin, R. C. 2007. Poplar leaf rusts: Model pathogens for a model tree. *Can. J. Bot.* 85:1127-1135.
- Fernandez, D., Tisserant, E., Talhinhas, P., Azinheira, H., Vieira, A., Petitot, A. S., Loureiro, A., Poulain, J., Da Silva, C., Silva, M. d. C., and Duplessis, S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Mol. Plant. Pathol.* 13:17-37.
- Flor, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust—its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685.
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/Wx-C-motif. *BMC Genomics* 11:317.
- Göhre, V., and Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:189-215.
- Guttman, D. S., Gropp, S. J., Morgan, R. L., and Wang, P. W. 2006. Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Biol. Evol.* 23:2342-2354.
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M. V., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P. C., Bollmann, S. R., Bos, J. I. B., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington,
- J. C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M. A., Fugelstad, J., Gilroy, E. M., Gnerre, S., Green, P. J., Grenville-Briggs, L. J., Griffith, J., Grünwald, N. J., Horn, K., Horner, N. R., Hu, C. H., Huitema, E., Jeong, D. H., Jones, A. M. E., Jones, J. D. G., Jones, R. W., Karlsson, E. K., Kunjeti, S. G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L. J., MacLean, D., Chibucos, M. C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H. J. G., Morgan, W., Morris, P. F., Munro, C. A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzón, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D. C., Schumann, U. D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D. J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P. J. I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B. C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P. R. J., Whisson, S. C., Judelson, H. S., and Nusbaum, C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461:393-398.
- Hacquard, S., Delaruelle, C., Legué, V., Tisserant, E., Kohler, A., Frey, P., Martin, F., and Duplessis, S. 2010. Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:1275-1286.
- Hacquard, S., Petre, B., Frey, P., Hecker, A., Rouhier, N., and Duplessis, S. 2011a. The poplar-poplar rust interaction: Insights from genomics and transcriptomics. *J. Pathogens.* doi:10.4061/2011/716041. Published online.
- Hacquard, S., Veneault-Fourrey, C., Delaruelle, C., Frey, P., Martin, F., and Duplessis, S. 2011b. Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for in planta RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75:106-112.
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J., Takken, F. L., and Rep, M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J.* 58:970-978.
- Jiang, R. H. Y., Tripathy, S., Govers, F., and Tyler, B. M. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:4874-4879.
- Joly, D. L., Feau, N., Tanguay, P., and Hamelin, R. C. 2010. Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.). *BMC Genomics* 11:422.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kale, S. D., Gu, B., Capelluto, D. G., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F. D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C. B., Shan, W., and Tyler, B. M. 2010. External lipid P13P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* 142:284-295.
- Kamoun, S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:41-60.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Sneltselaar, K., McCann, M., Pérez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Shirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C. H., Cahill, M.J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopman, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H. W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B. W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444:97-101.
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:1130-1139.
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S. Y., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B. 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* 22:1388-1403.
- Klee, E. W., and Ellis, L. B. M. 2005. Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC Bioinform.* 6:256.

- Laurans, F., and Pilate, G. 1999. Histological aspects of a hypersensitive response in poplar to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology* 89:233-238.
- Livak, K. J., and 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.
- Manning, V. A., and Ciuffetti, L. M. 2005. Localization of Ptr ToxA produced by *Pyrenophora tritici-repentis* reveals protein import into wheat mesophyll cells. *Plant Cell* 17:3203-3212.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P. E., Coutinho, P. M., Delaruelle, C., Detter, J. C., Deveaux, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucie, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P. J., Jain, P., Kilaru, S., Labbé, J., Lin, Y. C., Legué, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Oudot-Le Secq, M. P., Peter, M., Quesneville, H., Rahashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kües, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G. K., Polle, A., Pukkila, P. J., Richardson, P. M., Rouzé, P., Sanders, I. R., Stajich, J. E., Tuñlid, A., Tuskan, G. A., and Grigoriev, I. V. 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452:88-92.
- Morgan, W., and Kamoun, S. 2007. RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:332-338.
- Mosquera, G., Giraldo, M. C., Hyun Khang, C., Coughlan, S., and Valent, B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell* 21:1273-1290.
- Pallaghy, P. K., Norton, R. S., Nielsen, K. J., and Craik, D. J. 1994. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* 3:1833-1839.
- Panstruga, R., and Dodds, P. N. 2009. Terrific protein traffic: The mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* 324:748-750.
- Pinon, J., and Frey, P. 2005. Interaction between poplar clones and *Melampsora* populations and their implication for breeding for durable resistance. Pages 139-154 in: *Rust Diseases of Willow and Poplar*. M. H. Pei and A. R. McCracken, eds. CABI Publishing, Cambridge.
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G., and Martin, F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr. Biol.* 21:1197-1203.
- Posada, D., and Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.
- Povolotskaya, I. S., and Kondrashov, F. A. 2010. Sequence space and the ongoing expansion of the protein universe. *Nature* 465:922-926.
- Puthoff, D. P., Neelam, A., Ehrenfried, M. L., Scheffler, B. E., Ballard, L., Song, Q., Campbell, K. B., Cooper, B., and Tucker, M. L. 2008. Analysis of expressed sequence tags from *Uromyces appendiculatus* hyphae and haustoria and their comparison to sequences from other rust fungi. *Phytopathology* 98:1126-1135.
- Raffaële, S., Farrer, R. A., Cano, L. M., Studholme, D. J., MacLean, D., Thines, M., Jiang, R. H. Y., Zody, M. C., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Meyers, B. C., Nusbaum, C., and Kamoun, S. 2010. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. *Science* 330:1540-1543.
- Rafiqi, M., Gan, P. H., Ravensdale, M., Lawrence, G. J., Ellis, J. G., Jones, D. A., Hardham, A. R., and Dodds, P. N. 2010. Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* 22:2017-2032.
- Ravensdale, M., Nemri, A., Thrall, P. H., Ellis, J. G., and Dodds, P. N. 2011. Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. *Mol. Plant Pathol.* 12:93-102.
- Rehmany, A. P., Gordon, A., Rose, L. E., Allen, R. L., Armstrong, M. R., Whisson, S. C., Kamoun, S., Tyler, B. M., Birch, P. R. J., and Beynon, J. L. 2005. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by *RPP1* resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* 17:1839-1850.
- Rep, M. 2005. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 253:19-27.
- Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., Wincker, P., Le Thiec, D., Fluch, S., Martin, F., and Duplessis, S. 2007. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiol.* 144:347-366.
- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Schornack, S., Huitema, E., Cano, L. M., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaële, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M. E., Bos, J., Haas, B. J., Zody, M. C., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M., and Kamoun, S. 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Mol. Plant Pathol.* 10:795-803.
- Spanu, P. D., Abbott, J. C., Anselem, J., Burgis, T. A., Soanes, D. M., Stüber, K., Ver Loren van Themaat, E., Brown, J. K. M., Butcher, S. A., Gurr, S. J., Lebrun, M. H., Ridout, C. J., Schulze-Lefert, P., Talbot, N. J., Ahmadinejad, N., Ametz, C., Barton, G. R., Benjdia, M., Bidzinki, P., Bindschedler, L. V., Both, M., Brewer, M. T., Cadle-Davidson, L., Cadle-Davidson, M. M., Collemare, J., Cramer, R., Frenkel, O., Godfrey, D., Harriman, J., Hoede, C., King, B. C., Klages, S., Kleeman, J., Knoll, D., Kott, P. S., Kreplak, J., Lopez-Ruiz, F. J., Lu, X., Maekawa, T., Mahanil, S., Micali, C., Milgroom, M. G., Montana, G., Noir, S., O'Connell, R. J., Oberhaensli, S., Parlange, F., Pedersen, C., Quesneville, H., Reinhardt, R., Rott, M., Sacristan, S., Schmidt, S. M., Schön, M., Skamnioti, P., Sommer, H., Stephens, A., Takahara, H., Thordal-Christensen, H., Vigouroux, M., Weßling, R., Wicker, T., and Panstruga, R. 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science* 330:1543-1546.
- Steenackers, J., Steenackers, M., Steenackers, V., and Stevens, M. 1996. Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass Bioenerg.* 10:267-274.
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. G. M. 2009. Fungal effector proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:233-263.
- Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H. J., and de Wit, P. J. G. M. 2010. Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:7610-7615.
- Templeton, M. D., Rikkerink, E. H. A., and Beever, R. E. 1994. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:320-325.
- Terauchi, R., and Yoshida, K. 2010. Towards population genomics of effector-effector target interactions. *New Phytol.* 187:929-939.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Tyler, B. M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R. H. Y., Aerts, A., Arredondo, F. D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J. L., Chapman, J., Damasceno, C. M. B., Dorrance, A. E., Dou, D., Dickerman, A. W., Dubchak, I. L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S. G., Govers, F., Grunwald, N. J., Huang, W., Ivors, K. L., Jones, R. W., Kamoun, S., Kramps, K., Lamour, K.H., Lee, M. K., McDonald, W. H., Medina, M., Meijer, H. J. G., Nordberg, E. K., MacLean, D. J., Ospina-Giraldo, M. D., Morris, P. F., Phuntumart, V., Putnam, N. H., Rash, S., Rose, J. K. C., Sakihama, Y., Salamov, A. A., Savidor, A., Scheuring, C. F., Smith, B. M., Sobral, B. W. S., Terry, A., Torto-Alalibo, T. A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S., and Boore, J. L. 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313:1261-1266.
- van den Hooven, H. W., van den Burg, H. A., Vossen, P., Boeren, S., de Wit, P. J., and Vervoort, J. 2001. Disulfide bond structure of the AVR9 elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a cystine knot. *Biochemistry* 40:3458-3466.
- Van der Merwe, M. M., Kinnear, M. W., Barrett, L. G., Dodds, P. N., Ericson, L., Thrall, P. H., and Burdon, J. J. 2009. Positive selection in *AvrP4* avirulence gene homologues across the genus *Melampsora*. *Proc. R. Soc. B* 276:2913-2922.
- Voegelé, R. T., and Mendgen, K. 2003. Rust haustoria: Nutrient uptake and beyond. *New Phytol.* 159:93-100.
- Voegelé, R. T., Hahn, M., and Mendgen, K. 2009. The Uredinales: Cytology, biochemistry, and molecular biology. Pages 69-98 in: *The Mycota, Volume 5: Plant Relationships*. H. B. Deising, ed. Springer, Berlin.
- Wang, C. L., Guncar, G., Forwood, J. K., The, T., Catanzariti, A. M., Lawrence, G. J., Loughlin, F. E., Mackay, J. P., Schirra, H. J., Anderson, P. A., Ellis, J. G., Dodds, P. N., and Kobe, B. 2007. Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and -D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *Plant Cell* 19:2898-2912.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I. K., Leighton, P., and Birch, P. R. J. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450:115-118.

- Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K. V., Cano, L. M., Chaparro-García, A., Ammar, R., Staskawicz, B. J., and Kamoun, S. 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell* 19:349-2369.
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-García, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., and Shirasu, K. 2011. Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:14682-14687.
- Yang, Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24:1586-1591.
- Zhou, J. M., and Chai, J. 2008. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:179-185.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

- Broad Institute Puccinia Group database: www.broadinstitute.org/annotation/genome/puccinia_group/MultiHome.html
- Department of Energy Joint Genome Institute fungi portal: genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf
- Department of Energy Joint Genome Institute *Melampsora* genome portal: genome.jgi-psf.org/Mellp1/Mellp1.home.html
- INRA MycorWeb Genome Resources: mycor.nancy.inra.fr/genomeResources.php
- National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo
- University of California Berkeley WebLogo server: weblogo.berkeley.edu

Article n° 7 : Poplar leaf rust candidate effectors: virulence activities, structural characterization and plant targets

Benjamin Petre, Hugo Germain, Arnaud Hecker, Pascale Tsan, Joakim Bygdell, Gunnar Wingsle, Armand Séguin, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

Article préliminaire en préparation

Cinq fichiers de matériel supplémentaires sont associés à cet article:

- quatre figures supplémentaires sont disposées à la fin de l'article
- une table supplémentaire est disponible en version électronique

Poplar leaf rust candidate effectors: virulence activities, structural characterization and plant targets

Benjamin Petre¹, Hugo Germain², Arnaud Hecker¹, Pascale Tsan³, Joakim Bygdell⁴, Gunnar Wingsle⁴, Armand Séguin⁵, Nicolas Rouhier¹, Sébastien Duplessis^{1*}

¹INRA[†], Unité Mixte de Recherche 1136 INRA/Université de Lorraine 'Interactions Arbres/Microorganismes', Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France ;

²Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada ;

³UMR 7036 CNRS/Université de Lorraine 'Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisation', Nancy, France ; ⁴Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå Plant Science Centre, Umeå, Sweden ;

⁵Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre, Quebec, Canada

*contact: duplessi@nancy.inra.fr

ABSTRACT

Rust fungi are devastating obligate biotroph plant pathogens, but molecular determinants of their pathogenicity are still poorly understood. The recent analysis of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* genome sequence helped identifying families of small-secreted proteins of unknown function, considered as candidate effectors. In particular, MlpP4 and MlpH1 gene families encode cys-rich proteins that present signatures of evolution under positive selection in *M. larici-populina*. MlpP4 proteins are homologs of *Melampsora lini* AvrP4 avirulence factor whereas MlpH1 proteins have no homologs in other species. Here, we selected MlpP4.1 and MlpH1.1, the most induced members of each family during the infection, for functional characterization. MlpP4.1 and MlpH1.1 showed virulence activities when delivered from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 into *Arabidopsis thaliana* leaf cells. No evidence for cell entry was obtained by incubating the recombinant proteins fused to GFP with intact plant tissues, but a nucleo-cytoplasmic localisation was observed using transient or stable over-expression in tobacco and arabidopsis cells, respectively. Using histidine-tagged recombinant MlpP4.1 and MlpH1.1, some protein partners were isolated by pull-down assays from soluble protein extracts of poplar and arabidopsis leaves. In particular, this fishing approach allowed identifying several types of proteases and a secreted LRR-protein. The biochemical and structural characterization of both recombinant proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy has been initiated. It revealed that MlpP4.1 is thermo-resistant and displays a quite rigid C-terminal region likely resulting from the existence of intra-molecular disulfide bridges forming a cystine-knot motif. In contrast, the abundantly charged N-terminal part has a more flexible backbone that could help to interact with target molecules. This study, although in a preliminary state, would ultimately provide one of the first insights into virulence factors of rust fungi.

INTRODUCTION

Rust fungi are obligate biotrophs that collectively infect almost all plant families and devastate cultures (Voegelé *et al.*, 2009; Dean *et al.*, 2012). Recently, the emergence of highly-virulent Ug99 races of the wheat stem rust fungus *Puccinia graminis* revived a threat for world wheat production and global food supply (Singh *et al.*, 2011). Uncontrolled epidemics illustrated that our limited knowledge on molecular strategies employed by pathogens to infect their hosts prevents to rapidly adapt to new virulences (Dodds and Rathjen 2010). Some rust agents such as the flax rust fungus *Melampsora lini* are well-established models for the study of the molecular determinants of avirulence, although no major insights regarding virulence functions have been done on this system (Lawrence *et al.*, 2007).

To grow and reproduce, obligate biotrophs manipulate host living tissues using secreted effectors that can directly suppress plant defense responses and modulate host physiology to the advantage of the parasite (Hogenhout *et al.*, 2009). In fungi, effectors identified so far are mostly lineage-specific small-secreted proteins (SSP) of unknown function that are induced during the infection and that often present signatures of evolution under positive selection (Stergiopoulos and de Wit 2009; Rafiqi *et al.*, 2012). Fungal effectors that function outside plant cells are often cysteine-rich proteins and some can confer enhanced virulence by directly inhibiting plant proteases or peroxidases (Rooney *et al.*, 2005; Hemetsberger *et al.*, 2012). A few fungal effectors have been clearly demonstrated to be translocated from the pathogen inside plant cells (Kemen *et al.*, 2005; Plett *et al.*, 2011; Rafiqi *et al.*, 2010) and to contribute in there to fungal virulence (Djamei *et al.*, 2011). Several studies suggested that fungal and oomycete effectors enter host cell independently of the presence of the pathogen (Dou *et al.*, 2008; Rafiqi *et al.*, 2010). Kale and colleagues proposed recently that effector cell entry depends of the binding to host phosphatidyl inositol-3-phosphate (PI3P Kale *et al.*, 2010), although this proposed mechanism has been extensively controverted (Gan *et al.*, 2010 ; Yaeno *et al.*, 2011 ; Ellis and Dodds 2011 ; Bozkurt *et al.*, 2012).

This last decade, the release of the first genome sequences of plant filamentous pathogens allowed establishing catalogs of candidate effectors (Schmidt and Panstruga, 2011; Raffaele and Kamoun 2012). From these lists, high-throughput *in planta* expression screens have been developed to address their virulence activity (Oh *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Fabro *et al.*, 2011) or sub-cellular localisation (Schornack *et al.*,

2010; Caillaud *et al.*, 2012). Noteworthy, systems have been engineered to deliver candidate effectors inside plant cells from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 and simultaneously monitor bacterial growth in the leaves as a proxy to estimate virulence activities (Sohn *et al.*, 2007; Rentel *et al.*, 2008; Fabro *et al.*, 2011). The identification of effector plant targets provided significant advances in our understanding of eukaryotic effector virulence functions (Bos *et al.*, 2010; Bozkurt *et al.*, 2011; Caillaud *et al.*, 2012; Hemetsberger *et al.*, 2012). Associated with structure/function analyses of recombinant effectors, it revealed how effectors bind plant partners and how co-evolution with the plant promoted the diversification of surface-exposed amino acids (Wang *et al.*, 2007; Catanzariti *et al.*, 2010; Yaeno *et al.*, 2011; Chou *et al.*, 2011; Leonelli *et al.*, 2011; Boutemy *et al.*, 2011; Win *et al.*, 2012).

The rust fungus *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) is responsible of the leaf rust disease on poplar, which leads to considerable losses in plantations and limit wood production (Duplessis *et al.* 2009; Hacquard *et al.*, 2011). Genome sequence of *Mlp* contains 1,184 genes encoding cysteine-rich SSP of unknown function that are mostly species-specific and induced during the infection (Duplessis *et al.*, 2011a, 2011b). From these data, catalogs of candidate rust effectors have been dressed (Hacquard *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 2012). Interestingly, two gene families encode modular SSP with a relatively conserved N-terminal domain and a cysteine-rich C-terminus that present signatures of evolution under positive selection inside *Mlp* genome (Hacquard *et al.*, 2012). The CPGH1 (renamed MlpH1 herein) and CPG5464 (renamed MlpP4 herein) families contain 30 and 13 members, respectively. Members of the MlpH1 family have no homologs in other species, whereas members of the MlpP4 family are close homologs of *M. lini* AvrP4 avirulence factors. Some members of each family are highly induced during the colonization of poplar leaves by *Mlp*.

In this study, we report the functional characterization of MlpP4.1 and MlpH1.1 candidate effectors. When expressed in non-host plants, these proteins present a nucleocytoplasmic localisation and are able to enhance bacterial pathogen virulence. Besides, the production of recombinant proteins, allowed initiating their biochemical and structural characterization and isolating plant candidate protein partners.

RESULTS

Members of MlpP4 and MlpH1 gene families enhance bacterial growth when delivered from Pst into A. thaliana leaves

From a precedent study, we reported that genes MlpP4.1, MlpP4.2, MlpH1.1 and MlpH1.2 are strongly expressed during poplar leaf colonization by *Mlp* (Hacquard *et al.*, 2012). *MlpP4.1* and *MlpP4.2* are close paralogs among the MlpP4 family, which encode mature proteins of 69 and 65 amino acids respectively (Figure 1A). They have an N-terminal part enriched in charged residues and a C-terminal region that possess six conserved cysteines predicted to form a cystine-knot structure (Figure 1A). This typical protein organization is shared by all members of the MlpP4 family as well as by alleles of *M. lini* AvrP4. *MlpH1.1* and *MlpH1.2* are also close paralogs among the MlpH1 family, which encode very small mature proteins of 50 and 54 amino acids, respectively. Several acid residues are found in the N-terminal part, whereas the C-terminal part contain 3 and 4 cysteines respectively that are partially conserved in the family (Figure 1B). Prediction programs indicate that all members of both protein families exhibit very conserved N-terminal signal peptides for protein secretion. For all these reasons, MlpP4.1, MlpP4.2, MlpH1.1 and MlpH1.2 represent good candidate effectors.

In order to assess their potential virulence activities, the proteins were delivered through the *Pst* DC3000 type III secretion system into *A. thaliana* leaf cells. Bacterial growth in leaves was estimated by counting 0 and 3 days after infiltration (dai) and used as a proxy to evaluate virulence activities. At 3 dai, the 4 proteins tested conferred a significant enhanced growth to bacteria (from 0.2 up to 1 log) compared with strains transformed with the empty vector (Figure 2; Figure S1; TableS1A).

Recombinant MlpP4.1 and MlpH1.1 do not bind to phospholipids or Mlp spores and do not enter plant cells when fused to GFP

The results obtained from the virulence assay indicated that the four candidate effectors likely function as cytoplasmic virulence factors. It was recently suggested that RXLR (arginine-any amino acid-leucine-arginine) or degenerated RXLR-like motifs could mediate the cell entry of cytoplasmic oomycete and fungal effectors through the specific binding to PI3P (Kale *et al.*, 2010). Although some controversies exist about the role of this motif and its occurrence in fungi, the presence of a KSLR (lysine-serine-leucine-arginine) motif in the N-terminal region of MlpP4.1, prompted us to investigate candidate effector ability to bind phospholipids and enter plant cells.

First, we analysed the ability of GFP fusions (MlpP4.1-GFP and MlpH1.1-GFP) produced as recombinant proteins in *E. coli* to bind phospholipids in lipid-filter or liposome-binding assays as described previously (Kale *et al.*, 2010). We did not observe any binding of MlpP4.1 or MlpH1.1 to a range of 6 different phospholipids (see methods; [data not shown](#)). Considering that the presence of GFP could generate some steric hindrance, the mature form of each protein with N- or C-terminal hexa-histidine tags have also been used, but none of them was able to bind to phospholipids. On the other hand, the ability of MlpP4.1-GFP and MlpH1.1-GFP to translocate inside plant cells was tested by incubating purified proteins with different plant tissues such as onion leaf epidermis, poplar cells in culture or entire roots from poplar grown *in vitro*. In all cases, no fluorescence was detected inside the cells ([data not shown](#)). In contrast, fluorescence synonymous of cell entry was visible upon incubation with poplar roots cut into small pieces. Nevertheless, a signal was also observed with recombinant GFP alone, suggesting that cells from excised roots internalized extracellular proteins unspecifically ([data not shown](#)). As we have not profited of a positive control able to bind phospholipids or enter plant cells specifically, we considered these lipid-filter and cell entry experiments as inconclusives.

Alternatively, as several secreted proteins from fungi have been reported to bind components of fungal cell wall (de Jonge *et al.*, 2009), the ability of the recombinant proteins fused to GFP or not to attach to *Mlp* spores was investigated using a recently developed pull-down assay (Petre *et al.*, unpublished). Again, none of them has been able to bind to the spores ([data not shown](#)).

MlpP4.1 and MlpH1.1 fused to GFP show a nucleo-cytoplasmic localisation in plant cells

Assuming that MlpP4.1 and MlpH1.1 could be cytoplasmic effectors, we tried to determine their sub-cellular localisation inside plant cells. For this purpose, MlpH1.1-GFP and MlpP4.1-GFP, devoid of their N-terminal signal peptide, were transiently over-expressed in tobacco leaf cells. Both constructs generated a pronounced round-shaped single-spot signal associated with some fluorescence in the periphery of the cells, what is typical of the labelling of the nucleus and of the cytoplasm ([Figure 3](#)). We also generated stable *A. thaliana* plants over-expressing MlpH1.1-GFP and MlpP4.1-GFP. In the root cells of these mutants, a similar nucleo-cytoplasmic localisation was observed ([Figure S2A](#)). Interestingly, *A. thaliana* plants over-expressing MlpH1.1-GFP presented a

developmental phenotype, with a precocious development of siliques from immature flowers (Figure S2B).

Biochemical and structural analysis of recombinant MlpP4.1 and MlpH1.1

The resolution of the tridimensional (3D) structure of effectors is a powerful tool to investigate their biochemical function and find how they interact with other macromolecules, would it be proteins, lipids or nucleic acids (Win *et al.*, 2012; Yaeno *et al.*, 2011; Mak *et al.*, 2012). The size of both mature MlpH1.1 and MlpP4.1 is clearly adequate for nuclear magnetic resonance (NMR) studies. The ^1H - ^{15}N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra of both ^{15}N -labelled proteins allowed assigning ^1H - ^{15}N resonances for almost all residues, except the five N-terminal amino acids for MlpP4.1 and L₄₁ and C₄₂ residues for MlpH1.1 (Figure S3). MlpP4.1 sequential assignment was confirmed by an HNCA experiment, which moreover provided C $^\alpha$ resonances. The resolution of the 3D structure of both proteins is in progress, but we have already investigated the backbone dynamic properties of MlpP4.1 by ^{15}N relaxation measurements. Heteronuclear ^1H - ^{15}N nuclear Overhauser effect (NOE) values showed a contrasted profile with low values for N-terminal residues (indicative of a flexible structure) and high values for C-terminal residues (indicative of a rigid structure). Indeed, amino acids D₆ to G₃₈ and C₃₉ to L₆₉ presented HN NOE averaged values of 0.26 ± 0.05 and 0.66 ± 0.10 , respectively (Figure 4A). Interestingly in MlpP4.1, 6 out of the 8 cysteines are gathered in the C-terminal region between Cys₃₉ and Cys₆₉, following a spacing (C-X₂₋₇-C-X₃₋₁₀-C-X₀₋₇-C-X₁₋₁₇-C-X₄₋₁₉-C) typical of cystine-knot structures, i.e., 3 intricate disulfide bridges that confer very high stability to proteins (Figure 1; Daly and Craik 2011). Hence, it is very likely that rigidity originates from the structure formed by these cysteines.

Next, we sought to determine whether these disulfides are formed and whether they influence the stability and/or the oligomerization state of the protein by covalent bonds. A single peak corresponding to the theoretical mass of MlpP4.1 monomer (6,1 kDa) was obtained by mass spectrometry (data not shown). The titration of free thiol groups in an untreated recombinant MlpP4.1 gave an averaged value of 1 mole SH per mol protein. Considering the presence of 8 cysteines in the protein, these results are consistent with the existence of 3 intramolecular disulfide bridges (Figure 4B). The thermostability of MlpP4.1 was estimated by heating the protein for 10 min at 95°C. The fact that the protein remained in solution led us to conclude that it is thermosoluble, although it does

not indicate whether it is still well folded. In order to investigate the role of the disulfides for such property, we should compare the results obtained with an oxidized and a reduced protein. However, as assessed by thiol titration experiments, we failed to obtain a complete reduction of these disulfides despite extensive incubation of the protein at high temperatures, in denaturing and reducing environments. Altogether, these results indicate that recombinant MlpP4.1 is likely properly folded by *E. coli*, is oxidized at the end of an aerobic purification, and that the disulfide bridges, which are somehow resistant to reduction, confer a high rigidity and stability to the protein.

Isolation of MlpP4.1 and MlpH1.1 protein partners

The identification of effector targets is a crucial step toward its characterisation (Yaeno *et al.*, 2011; Bozkurt *et al.*, 2011). For identifying MlpP4.1 and MlpH1.1 plant partners, his-tagged MlpP4.1 and MlpH1.1 recombinant proteins were incubated with soluble proteins from poplar or arabidopsis leaves. Subsequently, protein complexes were isolated by affinity chromatography and identified by mass spectrometry (LC-MS-MS; **Table 1**). A total of 34 partners were identified: 10 from poplar for MlpP4.1, 17 and 18 respectively from poplar and arabidopsis for MlpH1.1. Among those proteins, a few enzymes involved in primary metabolism, chloroplastic photosystems, glycolysis or mitochondria metabolism have been identified. Whether it has a physiological significance is not yet clear. Besides, there are several homologs of known effector targets that participate to plant defense mechanisms against pathogens. For instance, enzymes involved in redox balance and ROS detoxification such as peroxiredoxins as well as glutaredoxins and peroxidases interacted specifically with MlpH1.1 and MlpP4.1 respectively. Moreover, although the number of peptides detected is weak, 3 different types of proteases (i.e. a poplar metallopeptidase as well as a cysteine and an aspartyl protease from arabidopsis) interacted with MlpH1.1. A poplar subtilisin-like serine endopeptidase (or subtilase, 28 peptides identified) was identified from the MlpP4.1 fishing experiment. Noteworthy, a uncharacterized secreted leucine-rich repeat (LRR)-protein from arabidopsis was identified as a partner of MlpH1.1. Poplar lipid-transfer proteins (LTP), that are well-known antimicrobial peptides, and a pectin methylesterase (PME), homolog of an arabidopsis PME targeted by a biotroph nematode effector, are partners shared by both effector candidates (Hewezi *et al.*, 2008).

DISCUSSION AND PERSPECTIVES

Do MlpP4 and MlpH1 families encode virulence factors?

The virulence activity of *Mlp* candidate effectors was analyzed using the heterologous pathosystem *A. thaliana*/*Pst* DC3000. The robustness of such experiments has been recently questioned considering the observed biological variability. In particular, the fact that some proteins could be secreted into plant cells in mis-folded forms and generate an unfolded protein response, could indeed possibly interfere with plant physiology (Fabro *et al.*, 2011; Bozkurt *et al.*, 2012). However, although we cannot rule out possible artefacts, only 7 proteins (MlpP4.1, MlpP4.2, MlpH1.1, MlpH1.2 and 3 additional proteins not presented here) presented an enhancement of bacterial virulence, among a list of 15 candidate effectors from *M. larici-populina* that have been tested (Germain *et al.*, unpublished). This is comparable to previous studies carried out with similar systems, where almost half of the tested candidate effectors generated a phenotype when expressed in leaves (Fabro *et al.*, 2011).

Considering that *M. larici-populina* cannot infect arabidopsis, which moreover belongs to a quite distant clade from poplar among Rosids, these results indicate that some effectors are functional in plant cells of non-host species, likely targeting conserved plant proteins as previously observed (Mukhtar *et al.*, 2011; Fabro *et al.*, 2011; Üstün *et al.*, 2012). Demonstrating virulence activities of the proteins in the right pathosystem is certainly crucial, but for the poplar-poplar rust interaction for which transformation is not yet feasible (Hacquard *et al.*, 2011), such observation open the way for high-throughput screens for virulence activities or sub-cellular localisation of candidate effectors in heterologous plants. At the opposite, the susceptibility of *A. thaliana* plants overexpressing MlpP4.1 or MlpH1.1 to different kind of pathogens would be investigated in the future.

Do MlpP4.1 and MlpH1.1 enter plant cells?

Despite many efforts, we did not observe any specific entry into plant cells using the recombinant proteins fused to GFP. Although we cannot exclude that MlpP4.1 and MlpH1.1 are not cytoplasmic effectors, the absence of internalisation might be explained by some steric hindrance or mis-folding caused by the fusion of GFP to very these small proteins. To ascertain that the absence of results in all these assays is not due to problems with experimental procedures, control experiments should be achieved with effectors that have been shown to enter the cells (Kale *et al.*, 2010). Alternatively, immunolocalisation of MlpP4.1 and MlpH1.1 in infected tissues will be performed in the

future, as it proved to be a valuable tool to determine the localisation of cytoplasmic fungal effectors (Kemen *et al.*, 2005; Rafiqi *et al.*, 2010; Djamei *et al.*, 2011). *M. lini* AvrP4 are recognized by a cytoplasmic resistance protein in flax, what suggest indirectly a cytoplasmic localisation of these effectors, and by extension a cytoplasmic localisation of *M. larici-populina* orthologs (Lawrence *et al.*, 2007).

What is the role of the N-terminus part of eukaryote effector proteins?

NMR experiments revealed that MlpP4.1 possesses two regions with distinct properties. Whereas the C-terminal part is likely rigidified through the existence of a cystine-knot motif, the N-terminal part should be quite flexible. Interestingly, most of the few effectors structurally characterized to date have a similar property, i.e., an N-terminal region with a predicted disordered structure (Boutemy *et al.*, 2011). For instance, *M. lini* effectors AvrL567 and AvrM have predicted disordered N-terminal regions that are susceptible to protease degradation (Wang *et al.*, 2007; Catanzariti *et al.*, 2010).

Flexible folds are known to be adaptable linkers that favour the ability to bind partners (Chouard 2011). The N-terminus of many cytoplasmic effectors being the important part of the protein that mediate cell entry, it is tempting to speculate that this flexible part is necessary to bind a target important for cell entry. The conservation of several charged strings of residus could also provide charged interfaces necessary for electrostatic interactions with charged partners.

Candidate plant targets: which one to keep?

We identified a total of 34 different proteins partners for MlpP4.1 and MlpH1.1, from arabidopsis and poplar soluble extracts. These results still need to be repeated and extended to arabidopsis proteins for MlpP4.1 and validated by yeast two hybrids to confirm a direct interaction. Indeed, methods used to identify protein-protein interactions are known to be prone to false positives and often require validations by alternative approaches (yeast-two-hybrid, DivIVA, direct interaction between proteins *in vivo* or *in vitro*). It is also worth mentioning here that any interaction with membrane proteins would be missed using this method.

The best candidates to investigate further have been selected by removing the 6 proteins that are targeted by both MlpP4.1 and MlpH1.1 and which included a lipid transfer protein and a pectin methylesterase, and highly abundant proteins associated with cell primary functions (e.g. photosystem subunits, elongation factors, cytochromes). Since both proteins showed a nucleo-cytoplasmic localisation, we only

considered proteins predicted to localise in the cytosol or secreted. Hence, proteins retained are homologs of proteins targeted by known effectors or involved in function important for plant defenses, which included several cytoplasmic and secreted proteases (Wulff *et al.*, 2009; Kaschani *et al.*, 2010; Bozkurt *et al.*, 2011; Van Der Linde *et al.*, 2012). MlpP4.1 could target a secreted poplar peroxidase, which is also interesting in the light of the recent finding that a homolog is a virulence target of fungal effector Pep1 in maize (Hemetsberger *et al.*, 2012). Another interesting putative interactant of MlpH1.1 obtained from an arabidopsis extract is a secreted LRR-protein, as these proteins can constitute virulence targets of effectors but also can be immune receptors recognizing them (Stergiopoulos and de Wit 2009; Deslandes *et al.*, 2012). Surprisingly, among the 50 candidate partners of MlpH1.1 and MlpH1.2 isolated using a yeast-two-hybrid screen of poplar and arabidopsis cDNA libraries, only a few proteins (LRR-proteins, cysteine and aspartyl proteases) have been also retrieved from the pull-down assays. This illustrates the need of using several complementary approaches because they often have some specificity.

METHODS

Biological material, growth conditions and inoculations

Hybrid poplars (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*, cultivar ‘Beaupré’) were cultivated in greenhouse as previously detailed (Rinaldi *et al.*, 2007). *Melampsora larici-populina* isolate 98AG31 (pathotype 3-4-7, virulent on ‘Beaupré’) was used in this study. Urediniospore multiplication, conservation and poplar leaf inoculation procedures were carried out as previously described (Rinaldi *et al.* 2007). *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) plants were grown at 22°C under 16 h light / 8 h dark cycles. Competent *Escherichia coli* strains DH5 α , DH10 β as well as Rosetta2 (DE3) pLysS were conserved at -80°C. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 and *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strains were used in this study.

Sequence analyses and names

Alignment and phylogenetic analyses were performed on the phylogeny website (www.phylogeny.fr) with default parameters. Alignments were corrected and edited manually, whereas phylogenetic trees were generated with FigTree v1.2.3. Protein parameters were estimated using protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Common names and JGI ID of genes described in this study are as follow: MlpP4.1 (Mlp-124256), MlpP4.2 (Mlp-124266), MlpH1.1 (Mlp-124497) and MlpH1.2 (Mlp-124499).

Expression and purification of recombinant proteins in Escherichia coli

Open reading frames (ORF) coding the mature forms of MlpP4.1 and MlpH1.1 (gene ID 124266 and 124499 respectively in *Mlp* strain 98AG31 reference genome) were ordered as synthetic genes cloned in pBSK(+) vectors (Genecust). Sequences coding for N- and C-terminal hexa-histidine (His₆)-tagged proteins were generated by PCR using primers containing the sequences for the 6 histidines and cloned into pET26b vectors (Novagen). For the production of recombinant MlpP4.1-GFP and MlpH1.1-GFP proteins with C-terminal His₆-tagged, ORF encoding GFP-fusions were amplified by PCR from pCK vectors and cloned in pET28a vectors. All proteins were produced in *E. coli strain* Rosetta2 (DE3) pLysS and purified as previously described (Petre *et al.*, unpublished; Couturier *et al.*, 2011) by immobilized metal affinity chromatography (IMAC select affinity gel, Sigma-Aldrich) optionally followed by size exclusion fast protein liquid chromatography (FPLC, Superdex75 column, GE Healthcare), and finally dialyzed against 30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (TE) pH 8.0 buffer. Recombinant protein purity was estimated by 15% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE ; Figure S4) For NMR spectroscopy analyses, ¹⁵N-labeled proteins were produced in bacteria grown in M9 minimal synthetic medium containing ¹⁵NH₄Cl (1 g/L) as previously described (Petre *et al.*, unpublished). After purification, proteins were dialyzed into a 50 mM phosphate pH 6.0 buffer and concentrated for immediate analysis. Primers, plasmid construction, proteins sequences, solutions, details on production and purification procedures are presented in Table S1B.

Recombinant protein reduction and thiol titration

Recombinant proteins were reduced with a 100 fold dithiothreitol (DTT) excess (usually 10 mM for 100 μM recombinant proteins) for 1h at room temperature, as previously reported (Rouhier *et al.*, 2004). Alternatively, they were tentatively denatured prior to the experiment by an incubation of 10 min at 95 °C in the presence of 0.2 % SDS. Proteins were then precipitated with 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) at 4 °C for 30 min, centrifuged 10 min at 10,000 x g and the pellet was washed twice with 1 % (w/v) TCA. The pellet was then resuspended in TE buffer with 1 % SDS (w/v). Protein concentration was quantified by spectrophotometry (epsilons; MlpP4.1: 0; MlpH1.1: 3,000; MlpP4.1-GFP: 22,000; MlpH1.1-GFP: 25,000) and/or chemical reactions (BCA

assay, Pierce). For thiol titration, 5 to 10 μM of native and pre-reduced recombinant proteins were incubated with 100 μM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) for 1h in the dark. Absorbance was measured at 412 nm and free-thiol content was calculated using a TNB- molar extinction coefficient of $13,600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ as previously reported (Rouhier *et al.*, 2004).

Isolation of protein partners of recombinant proteins by pull-down

Frozen Beaufré or *A. thaliana* Col-0 leaves were ground with a mortar and a pestle in liquid nitrogen and leaf powder was incubated in an extraction buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride [PMSF]) for 1h at 4°C under gentle shaking and centrifuged for 45 min at 50,000 g at 4°C. The supernatant was retained and soluble proteins were quantified with a colorimetric assay (BCA assay, Pierce). One milligram of recombinant proteins was incubated with 100 mg of leaf soluble proteins for 2h at 4 °C under gentle agitation, and the solution was loaded several times on a column of 1 mL of IMAC matrix (Sigma-Aldrich). After extensive wash with the extraction buffer, protein non-covalently bound to the recombinant proteins were eluted with an elution buffer concentrated in NaCl (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25 to 1 M NaCl, 10 mM Imidazole) and finally recombinant proteins were eluted with an elution buffer concentrated in NaCl and imidazole (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 500 mM Imidazole). Eluates were lyophilized and analyzed by nano liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described (Bäckstrom *et al.*, 2007).

Pst DC3000 in planta growth assay

Pst DC3000 carrying the gateway pVSP_PsSPdes vector (empty or recombinant) were grown overnight in liquid LB medium at 28°C, adjusted to an OD₆₀₀ of 0.001 to 0.0001 in 10 mM MgCl₂ and hand-infiltrated with a syringe without needle into the abaxial side of four-week-old *A. thaliana* Col-0 leaves. A minimum of 3 leaves/plant and 12 to 36 plants/condition were used. Infiltrated plants were maintained 3 more days in the growth cabinet, the first day under a dome to ensure maximal humidity. *In planta* growth of bacteria was quantified at 0 and 3 dai by retrieving bacteria from leaf disks and counting colony-forming units (cfu) from series of bacterial dilutions plated on LB-agar supplemented with appropriate antibiotics.

NMR spectroscopy

NMR spectra were acquired on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. For all samples, a 50 mM phosphate buffer at pH 6.0 with 0.02% sodium azide in H₂O/D₂O (90:10) was used as NMR buffer. COSY, TOCSY (mixing time of 60 ms) and NOESY (mixing time of 150 ms) experiments were run at 298 K on 0.85 and 0.65 mM unlabeled samples of MlpP4.1 and MlpH1.1, respectively. HSQC, TOCSY-HSQC (mixing time of 60 ms) and NOESY-HSQC (mixing time of 150 ms) experiments were recorded with 1.8 and 0.135 mM uniformly ¹⁵N-labeled samples of MlpP4.1 and MlpH1.1, respectively.

For MlpP4.1, HNHA, HNHB, R_1 and R_2 ¹⁵N relaxation rates, ¹H-¹⁵N heteronuclear NOE, HNCA (with 24 (¹⁵N) x 28 (¹³C) complex points and 192 transients per increment) standard experiments were recorded. Spectra were processed using Topspin3.0 (Bruker) and analyzed with NmrViewJ (Johnson and Blevins 1994), CcpNmr (Vranken *et al.*, 2005) and ARIA2 (Rieping *et al.*, 2007).

Agrobacterium-mediated arabidopsis transformation

A. tumefaciens carrying a binary vector encoding GFP-fusions of interest were grown in liquid YEP overnight, and adjusted to an OD₆₀₀ of 0.8 in 5 % sucrose, 0.01 % silvet and 20 µg/mL acetosyringone. Arabidopsis transformation was done as described previously (Clough and Bent 1998). Dipping was repeated after one week to increase the number of transformants. Transformed seedlings were selected by spraying 100 µg/mL Basta regularly.

Transient expression of GFP-fusions in Nicotiana benthamiana

ORF coding for full-length (i.e. with the signal peptide) as well as mature forms of MlpP4.1 and MlpH1.1 were cloned in frame with GFPS65C in C-terminal into pCK vectors (see Table S1B for details). *N. benthamiana* fully developed young-leaf cells were transfected with tungsten particles coated with recombinant plasmids by the mean of the PDS/1000-He particle delivery system (Bio-Rad) under a pressure of 1100 psi. After bombardment, plant material was maintained on MS medium in petri dishes under dark conditions at room temperature. Images were retrieved on an AxioLab A1 (Zeiss) epifluorescence microscope (excitation at 450 nm, filtered wavelength superior to 480 nm) ~16 h post-bombardment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Calypso Dard (master student) for excellent work on the microscope, Claire Veneault-Fourrey, Yohann Daguerre and Jonathan Plett (INRA Nancy) for providing *N. Benthamiana* plants and for their help with phospholipid-binding assays and cell-entry experiments. This work was funded by INRA and Région Lorraine grants to Sébastien Duplessis and Nicolas Rouhier. Benjamin Petre was supported by a young scientist grant (CJS) from INRA.

REFERENCES

- Bäckström S, Elfving N, Nilsson R, Wingsle G, Björklund S** (2007) Purification of a Plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* Identifies PFT1 as the Med25 Subunit. *Mol Cell* 26, 717-729
- Bos JIB, Armstrong MR, Gilroy EM, Boevink PC, Hein I et al.** (2010) *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* doi/10.1073/pnas.0914408107
- Boutemy LS, King SRF, Win J, Hughes RK, Clarke TA et al.** (2011) Structures of *Phytophthora* RXLR Effector Proteins. A Conserved but Adaptable Fold Underpins Functional Diversity. *J Biol Chem* 41: 35834-35842
- Bozkurt TO, Schornack S, Win J, Shindo T, Ilyas M et al.** (2011) *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* doi/10.1073/pnas.1112708109
- Caillaud M-C, Piquerez SJM, Fabro G, Steinbrenner J, Ishaque N et al.** (2012) Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *Plant J* 69: 252-265
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Ve T, Kobe B, Ellis JG** (2010) The AvrM Effector from Flax Rust Has a Structured C-Terminal Domain and Interacts Directly with the M Resistance Protein. *Mol Plant Microb Interact* 23: 49-57
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG** (2006) Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18, 243-256

- Chou S, Krasileva KV, Holton JM, Steinbrenner AD, Alber T *et al.*** (2011) *Hyaloperonospora arabidopsidis* ATR1 effector is a repeat protein with distributed recognition surfaces. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* doi/10.1073/pnas.1109791108
- Chouard T** (2011) Breaking the protein rules. *Nature* **471**: 151-153
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735-743
- Daly NL, Craik DJ** (2011) Bioactive cystine knot proteins. *Curr Opin Chem Biol* **15**, 362-368
- De Jonge R, Thomma BPHJ** (2009) Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* doi:10.1016/j.tim.2009.01.002
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A *et al.*** (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular pathology. *Mol Plant Pathol* DOI:10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V *et al.*** (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* doi:10.1038/nature10454
- Dodds PN, Rathjen J** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539-548
- Dou D, Kale SD, Wang X, Jiang RHY, Bruce NA *et al.*** (2008) RXLR-Mediated Entry of *Phytophthora sojae* Effector *Avr1b* into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. *Plant Cell* **20**: 1930-1947
- Duplessis S, Joly DL, Dodds PN** (2012) Rust Effectors, *In: Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.
- Duplessis S, Cuomo CA, Lin Y-C, Aerts A, Tisserant E *et al.*** (2011a) Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* doi/10.1073/pnas.1019315108
- Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P *et al.*** (2011b) *Melampsora larici-populina* Transcript Profiling During Germination and Timecourse Infection of Poplar Leaves Reveals Dynamic Expression Patterns Associated with Virulence and Biotrophy. *Mol Plant Microb Interact* **24**, 808-818
- Duplessis S, Major I, Martin F, Séguin A** (2009) Poplar and Pathogen Interactions: Insights from *Populus* Genome-Wide Analyses of Resistance and Defense Gene Families and Gene Expression Profiling. *Crit Rev Plant Sci* **28**, 309-334

- Ellis JG, Dodds PN** (2011) Showdown at the RXLR motif: Serious differences of opinion in how effector proteins from filamentous eukaryotic pathogens enter plant cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* doi/10.1073/pnas.1111668108
- Fabro G, Steinbrenner J, Coates M, Ishaque N, Baxter L et al.** (2011) Multiple Candidate Effectors from the Oomycete Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* Suppress Host Plant Immunity. *Plos Pathog* 11: e1002348
- Gan PHP, Rafiqi M, Ellis JG, Jones DA, Hardham AR et al.** (2010) Lipid binding activities of flax rust AvrM and AvrL567 effectors. *Plant Signal Behav* 5: 1-4
- Hacquard S, Joly DL, Lin Y-C, Tisserant E, Feau N et al.** (2012) A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identifies Candidate Effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust). *Mol Plant Microb Interact* 25, 279-293
- Hacquard S, Petre B, Frey P, Hecker A, Rouhier N et al.** (2011) The Poplar-Poplar Rust Interactions: Insights from Genomics and Transcriptomics. *J Pathog* doi:10.4061/2011/716041
- Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G** (2012) The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. *Plos Pathog* 5: e1002684
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S** (2009) Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Mol Plant-Microb Interact* 22: 115-122
- Johnson BA and Blevins RA** (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR* 4, 603-614
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, Dou D, Feldman E et al.** (2010) External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell* 142: 284-295
- Kaschani F, Shabab M, Bozkurt T, Shindo T, Schornack S et al.** (2010) An Effector-Targeted Protease Contributes to Defense against *Phytophthora infestans* and Is under Diversifying Selection in Natural Hosts. *Plant Physiol* 154: 1794-1804
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT** (2005) Identification of a Protein from Rust Fungi Transferred from *Haustoria* into Infected Plant Cells. *Mol Plant Microb Interact* 18, 1130-1139
- Lawrence GJ, Dodds PN, Ellis JG** (2007) Rust of flax and linseed caused by *Melampsora lini*. *Mol Plant Pathol* 8: 349-364

- Leonelli L, Pelton J, Schoeffler A, Dahlbeck D, Berger J et al.** (2011) Structural Elucidation and Functional Characterization of the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Effector Protein ATR13. *Plos Pathog* 12: e1002428
- Mukhtar MS, Carvunis A-R, Dreze M, Epple P, Steinbrenner et al.** (2011) Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. *Science* 333: 596-601
- Oh S-K, Young C, Lee M, Oliva R, Bozkurt TO et al.** (2009) In Planta Expression Screens of *Phytophthora infestans* RXLR Effectors Reveal Diverse Phenotypes, including Activation of the *Solanum bulbocastanum* Disease Resistance Protein Rpi-blb2. *Plant Cell* 21: 2928-2947
- Plett JM, Kempainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V et al.** (2011) A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Current Biol* 21: 1197-1203
- Raffaele S, Kamoun S** (2012) Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nat Rev Microbiol* doi:10.1038/nrmicro2790
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Hardham AR, Dodds PN** (2012) Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr Opin Plant Biol* 15: 1-6
- Rafiqi M, Gan PHP, Ravensdale M, Lawrence GJ, Ellis JG et al.** (2010) Internalization of Flax Rust Avirulence Proteins into Flax and Tobacco Cells Can Occur in the Absence of the Pathogen. *Plant Cell* 22: 2017-2032
- Rentel MC, Leonelli L, Dahlbeck D, Zhao B, Staskawicz BJ** (2008) Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* doi10.1073/pnas.0711215105
- Rieping W, Habeck M, Bardiaux B, Bernard A, Malliavin TE et al.** (2007) ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* 23, 381-382
- Rooney HCE, van't Klooster JW, van der Hoorn RAL, Joosten MHAJ, Jones JDG et al.** (2005) *Cladosporium* Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependant Disease Resistance. *Science* 308: 1783-1786
- Saunders DGO, Win J, Cano LM, Szabo LJ, Kamoun S et al.** (2012) Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *PLoS ONE* 1, e29847

- Schornack S, Van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M et al.** (2010) Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* doi/10.1073/pnas.1008491107
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S et al.** (2011) The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. *Annu Rev Phytopathol* 49: 465-481
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, Jones JDG** (2007) The Downy Mildew Effector Proteins ATR1 and ATR13 Promote Disease Susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 4077-4090
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM** (2009) Fungal Effector Proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47: 233-263
- Üstün S, Müller P, Palmisano R, Hensel M, Börnke F** (2012) SseF, a type III effector from the mammalian pathogen *Salmonella enterica*, requires resistance-gene-mediated signalling to activate cell death in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *New Phytol* doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04124.x
- Voegelé R, Hahn M, Mendgen K** (2009) The Uredinales: Cytology, Biochemistry, and Molecular Biology. In : *Karl Esser, editor. The Mycota, A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research, Plant Relationships, 2nd edition.* pp. 69-98
- Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A et al.** (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 687-696
- Wang Q, Han C, Ferreira AO, Yu X, Ye W et al.** (2011) Transcriptional Programming and Functional Interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR Effector Repertoire. *Plant Cell* 23: 2064-2086
- Wang C-IA, Guncar G, Forwood JK, Teh T, Catanzariti A-M et al.** (2007) Crystal Structures of Flax Rust Avirulence Proteins AvrL567-A and -D Reveal Details of the Structural Basis of Flax Disease Resistance Specificity. *Plant Cell* 19: 2898-2912
- Win J, Krasileva KV, Kamoun S, Shirasu K, Staskawicz BJ et al.** (2012) Sequence Divergent RXLR Effectors Share a Structural Fold Conserved across Plant Pathogenic Oomycete Species. *PLoS Pathog* 1, e1002400
- Yaeno T, Li H, Chaparro-Garcia A, Schornack S, Koshiba S et al.** (2011) Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector

AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* doi/10.1073/pnas.1106002108

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Sequence characteristics of proteins from MlpP4 and MlpH1 families

Phylogenetic trees were built from corresponding aligned protein sequences from MlpP4 (A) and MlpH1 (B) families. Branch length is proportional to phylogenetic distance. Black '+' indicate that expression of the gene has been detected *in planta* (Joly *et al.*, 2010; Duplessis *et al.*, 2011), red '+' indicate that the RT-qPCR expression profile of the gene has been established (Hacquard *et al.*, 2012). The black arrows indicate the predicted cleavage site of the signal peptide. Cysteine residues are in red, basic residues (lysine/K and arginine/R) are in blue, acid residues (aspartic acid/D and glutamic acid/E) are in green. Blue and green lines show basic and acid stretches of amino acids, whereas the red line delimited the predicted cystine-knot motif. A colon marks an amino acid conservation of 50% or more. A star marks an amino acid conservation of 90% or more.

Figure 2. Virulence assay in arabidopsis

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 strains were transformed with the gateway pVSP_PsSPdes vector, empty or carrying MlpP4.1, MlpH1.1 (A), MlpH1.2 (B) or MlpP4.2 (C). Bacteria were grown overnight in liquid LB medium at 28°C, adjusted to an OD₆₀₀ of 0.001 to 0.0001 in 10 mM MgCl₂ and hand-infiltrated with a syringe without needle into the abaxial side of four-week-old *A. thaliana* Col-0 leaves. *In planta* growth of bacteria was quantified at 0 and 3 days after infiltration by retrieving bacteria from leaf disks and counting colony-forming units (cfu) from series of bacterial dilutions plated on LB-agar supplemented with appropriate antibiotics. Error bar: SE, n≥3.

Figure 3. Transient expression of GFP-fused proteins in tobacco leaf cells

N. benthamiana fully developed young-leaf cells expressing MlpH1.1-GFP or MlpP4.1-GFP, observed under an epifluorescence microscope 16 hours after transfection by biolistic. Green signal correspond to GFP localisation in plant cells, in the nucleus (round-shaped spot) and in the cytosol (blurred halo along the intern periphery of the cells).

Figure 4. HN NOE backbone relaxation parameter and thiol titration of recombinant MlpP4.1

(A) The ^1H - ^{15}N nuclear Overhauser effect was measured on a 600 MHz spectrometer, at 298 K, on a 1.8 mM uniformly ^{15}N -labeled sample in phosphate buffer pH 6.0. Cysteine, basic and acid residues are represented respectively in red, blue and green in the MlpP4.1 sequence. (B) Thiol titration of either native or denatured and reduced recombinant MlpP4.1.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1. Repetitions of the virulence assays in arabidopsis

Same legend as Figure 2.

Figure S2. Arabidopsis thaliana plants overexpressing GFP-fused proteins.

(A) Root cells of *A. thaliana* plants overexpressing MlpP4.1-GFP or MlpH1.1-GFP visualized by confocal microscopy. (B) Phenotype of floral development observed in *A. thaliana* MlpH1.1-GFP overexpressing lines. The silique prematurely growth through a non-mature flower.

Figure S3. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of recombinant MlpP4.1 and MlpH1.1. The NMR experiment was recorded on a 600 MHz spectrometer, at 298 K, on a 1.8 mM uniformly ^{15}N -labeled sample in phosphate buffer pH 6.0. Backbone amide signals of MlpP4.1 (A) or MlpH1.1 (B) are labelled with the residue number and « sc » refers to side-chain amide signals.

Figure S4. SDS-PAGE of recombinant proteins

Ten micrograms of recombinant MlpP4.1, MlpH1.1, MlpP4.1-GFP and MlpH1.1-GFP have been separated by SDS-PAGE. The triangles indicate the band corresponding to the purified proteins.

Table S1. Details of the study.

(Sheet A) Raw values corresponding to the virulence assays are presented. (Sheet B) Details of cloning procedures and protein sequences.

Table 1. Proteinaceous partners of MlpP4.1 and MlpH1.1 identified in plants

protein	description	poplar		arabidopsis	accession numbers
		MlpP4.1	MlpH1.1	MlpH1.1	
PSBQ	photosystem II subunit	67	61	7	POPTR_0004s03160.1(40, 33); POPTR_0011s03390.1(27, 28); AT4G21280.2(5); AT4G05180.1(2)
-	Galactose mutarotase like protein			38	AT4G25900.1
HPR	hydroxypyruvate reductase		10	19	POPTR_0004s18190.1; AT1G68010.2
-	Hyaluronan mRNA binding protein			29	AT5G47210.1(17); AT4G16830.1(10); AT4G17520.1(2)
-	GTP binding Elongation factor Tu		10	18	POPTR_0008s04230.1; AT5G60390.1
PE 3.4	pectinesterase / plant invertase-PME inhibitor	13		10	POPTR_0014s14720.1(12); POPTR_0003s07040.1(1); AT5G62350.1
Subtilase	Subtilisin like serine endopeptidase	18			POPTR_0011s04970.1(9); POPTR_0011s04980.1(9)
CYTC-2	cytochrome c 2	8	8		POPTR_0013s10300.1
LTP	lipid transfer protein, predicted secreted	14	2		POPTR_0004s08500.1(11); POPTR_1545s00200.1(5)
Prx Q	Peroxiredoxin Q		9	2	POPTR_0006s13980.1; POPTR_0018s07400.1; AT3G26060.2
-	Translation initiation factor		7		POPTR_0004s08050.1(5); POPTR_0018s11300.1(2)
GAPDH	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase		5	2	POPTR_0014s13660.1(4); POPTR_0005s27550.2(1); AT1G12900.1
GrxC3	Glutaredoxin C3, predicted secreted	7			POPTR_0007s13630.1
MBD	methyl CPG binding domain protein	6			POPTR_0018s12980.1(4); POPTR_0006s06690.1(2)
Prx III	Peroxidase class III, predicted secreted	5			POPTR_0014s14000.1
PGK	phosphoglycerate kinase		4		POPTR_0008s08410.1
NRP1	Nodulin-related protein 1			4	AT2G03440.1
SHM	serine transhydroxymethyltransferase		3		POPTR_0008s00350.1
Metallopeptidase	metallopeptidase family M24		3		POPTR_0016s12720.1
Elf	eukaryotic elongation factor		3		POPTR_0006s19870.1
-	Glycine cleavage T protein	2	1		POPTR_0021s00380.1
-	Gibberellin regulated protein			3	AT5G14920.1
PRPL11	plastid ribosomal protein L11		1	1	POPTR_0001s45510.1; AT1G32990.1
-	RNA binding RRM RBD RNP motifs family protein		1		POPTR_0001s02370.1
-	RNA binding CRS1 YhbY CRM domain protein		1		POPTR_0007s01860.1
-	NAD P binding Rossmann fold superfamily protein		1		POPTR_0005s11830.1
-	chloroplastic thylakoid lumen protein	1			POPTR_0006s06680.1
ROF / FKBP	rotamase			1	AT3G25230.2
PCAP1	plasma membrane associated cation binding protein 1			1	AT4G20260.4
LRR-P	LRR family protein, predicted secreted			1	AT1G33590.1
Cys protease	OTU-like cysteine proteinase			1	AT3G62940.2
Asp protease	eukaryotic aspartyl protease, predicted secreted			1	AT3G54400.1
-	Unknown protein			1	AT3G23450.1
-	Unknown protein, DUF 1014			1	AT1G16210.1

Figure 1

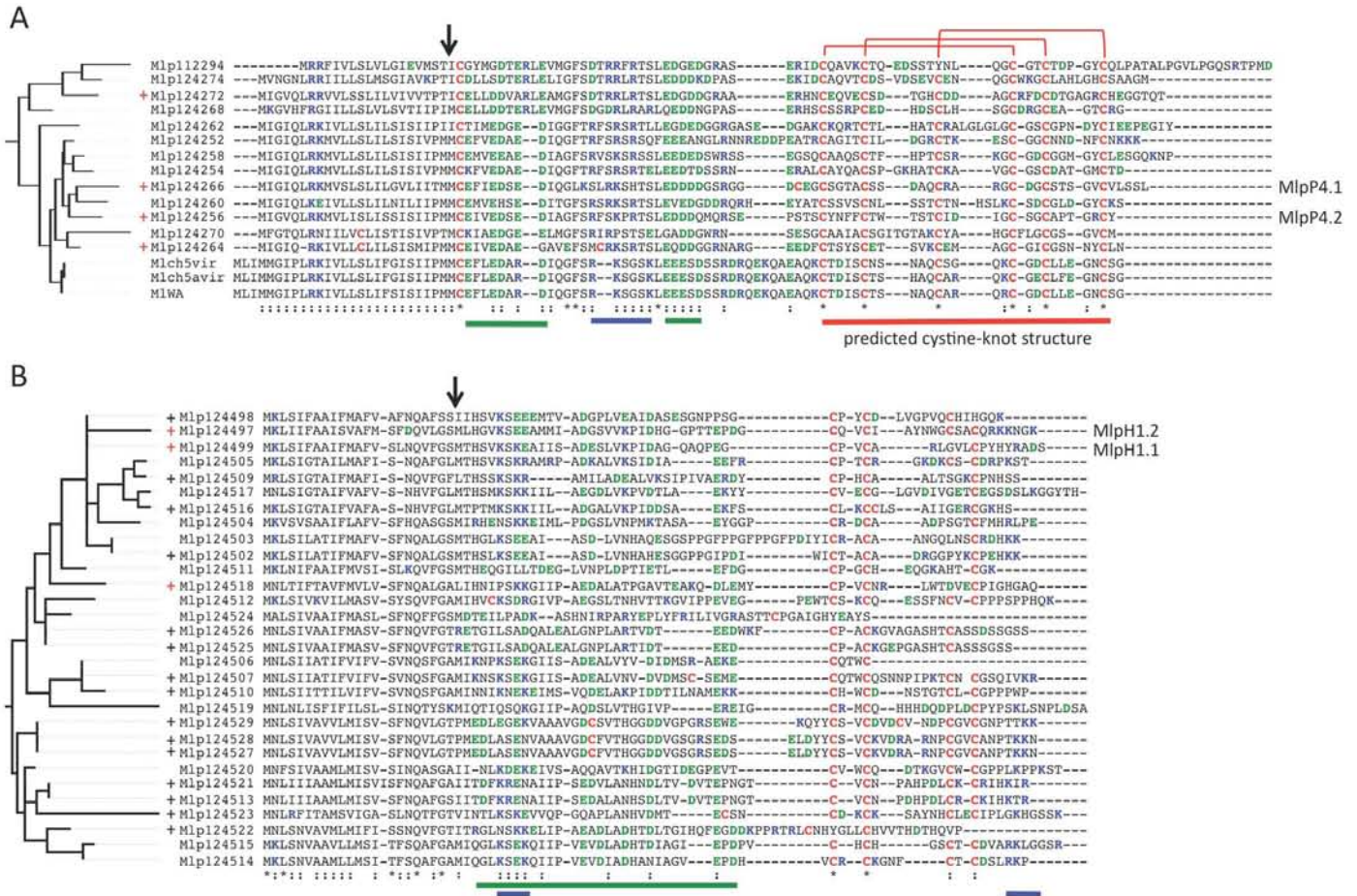


Figure 2

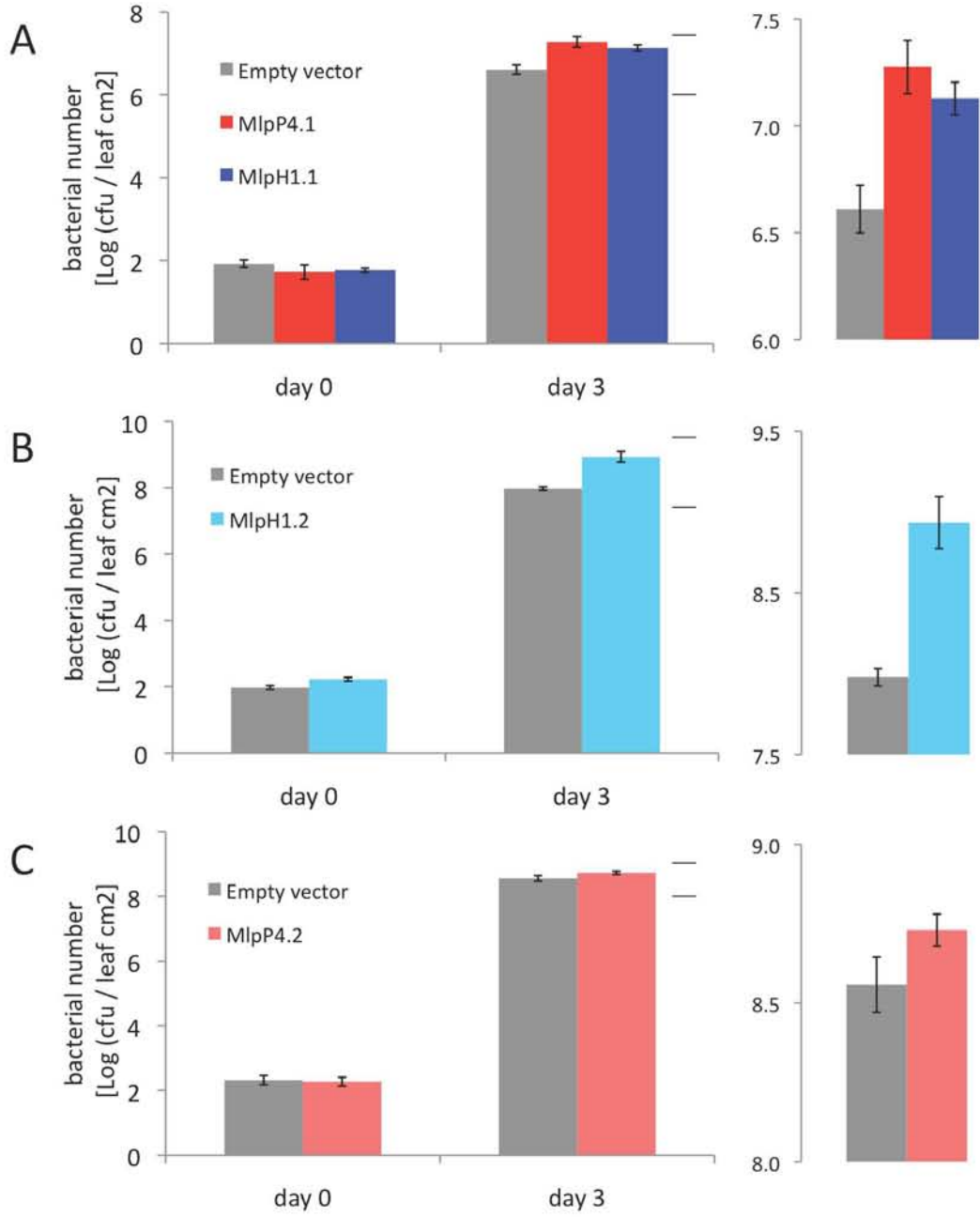


Figure 3

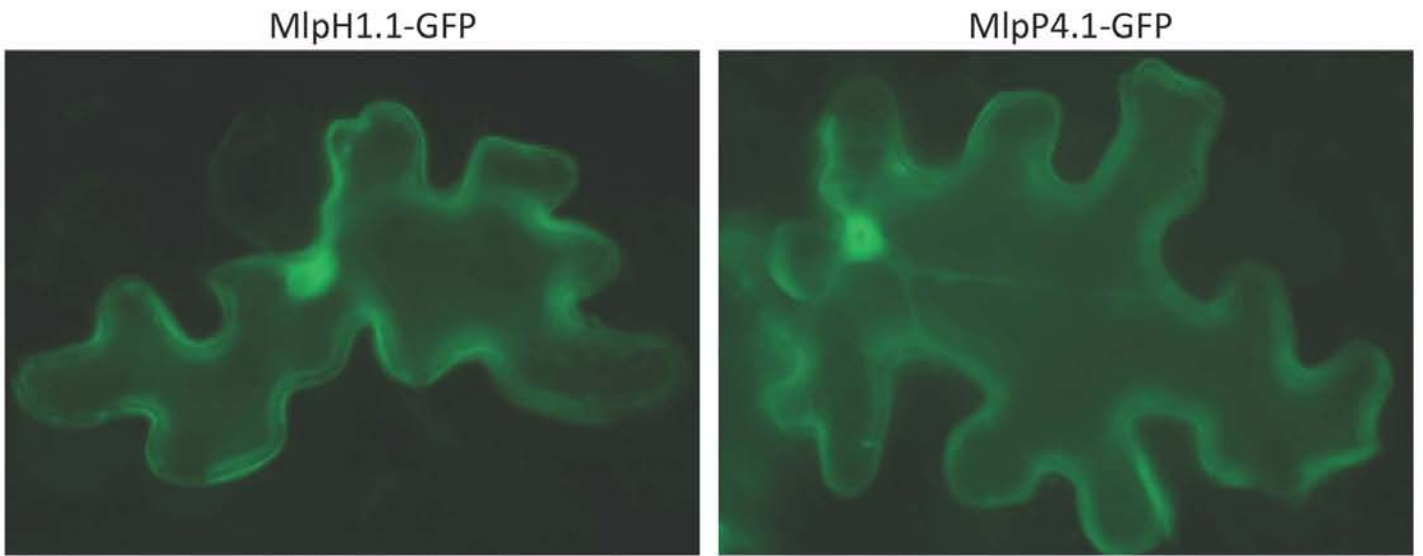


Figure 4

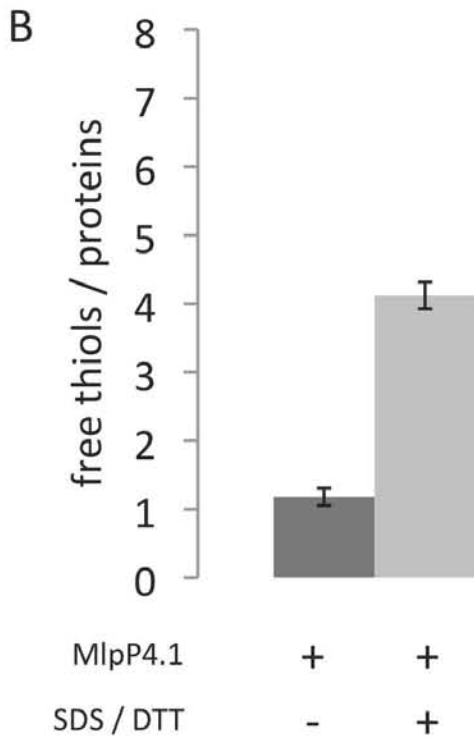
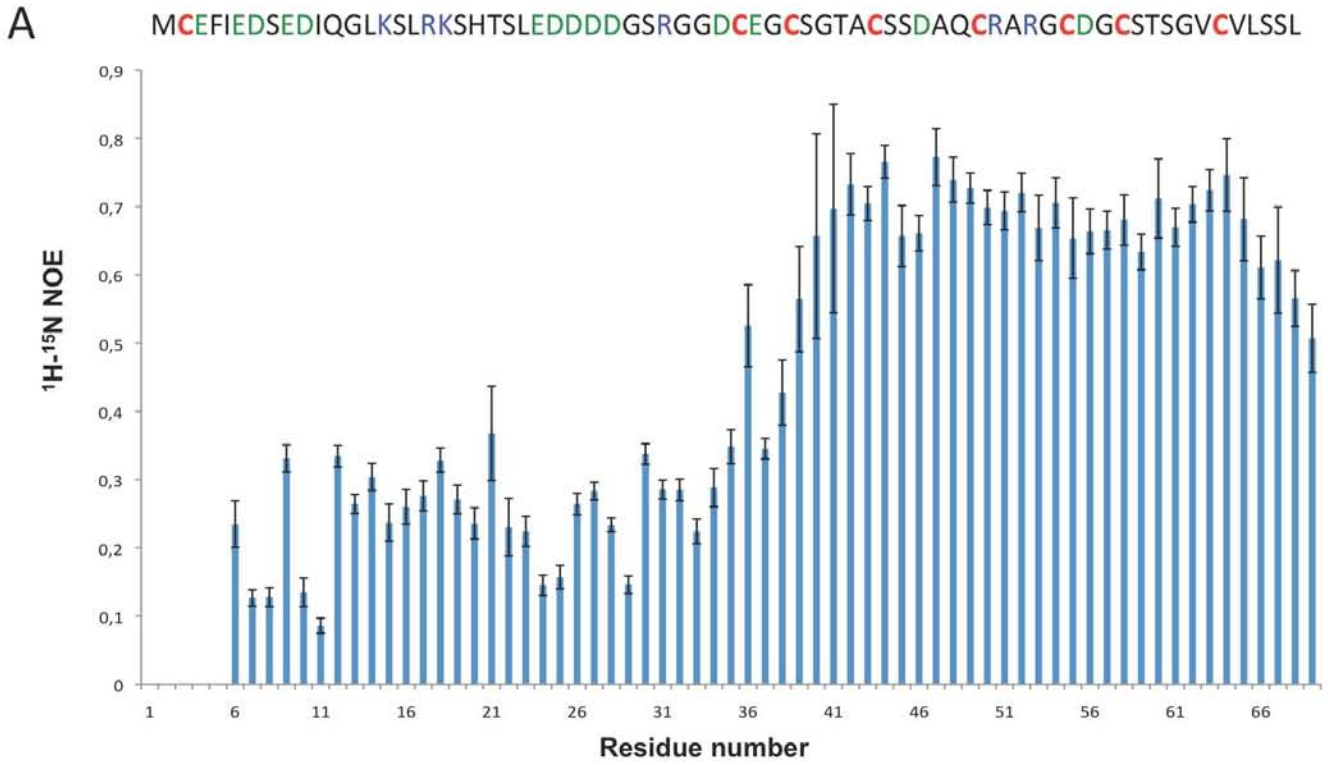


Figure S1

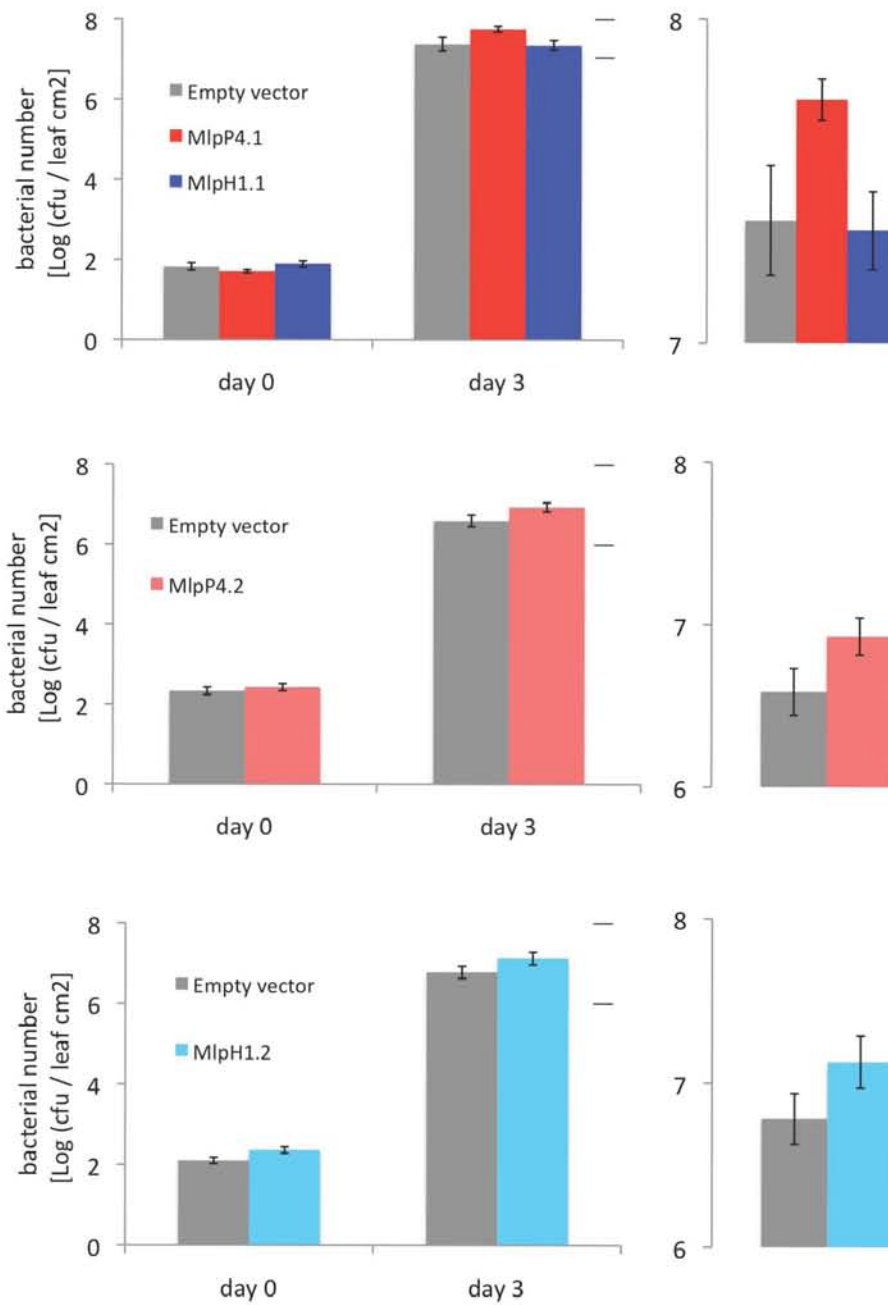


Figure S2

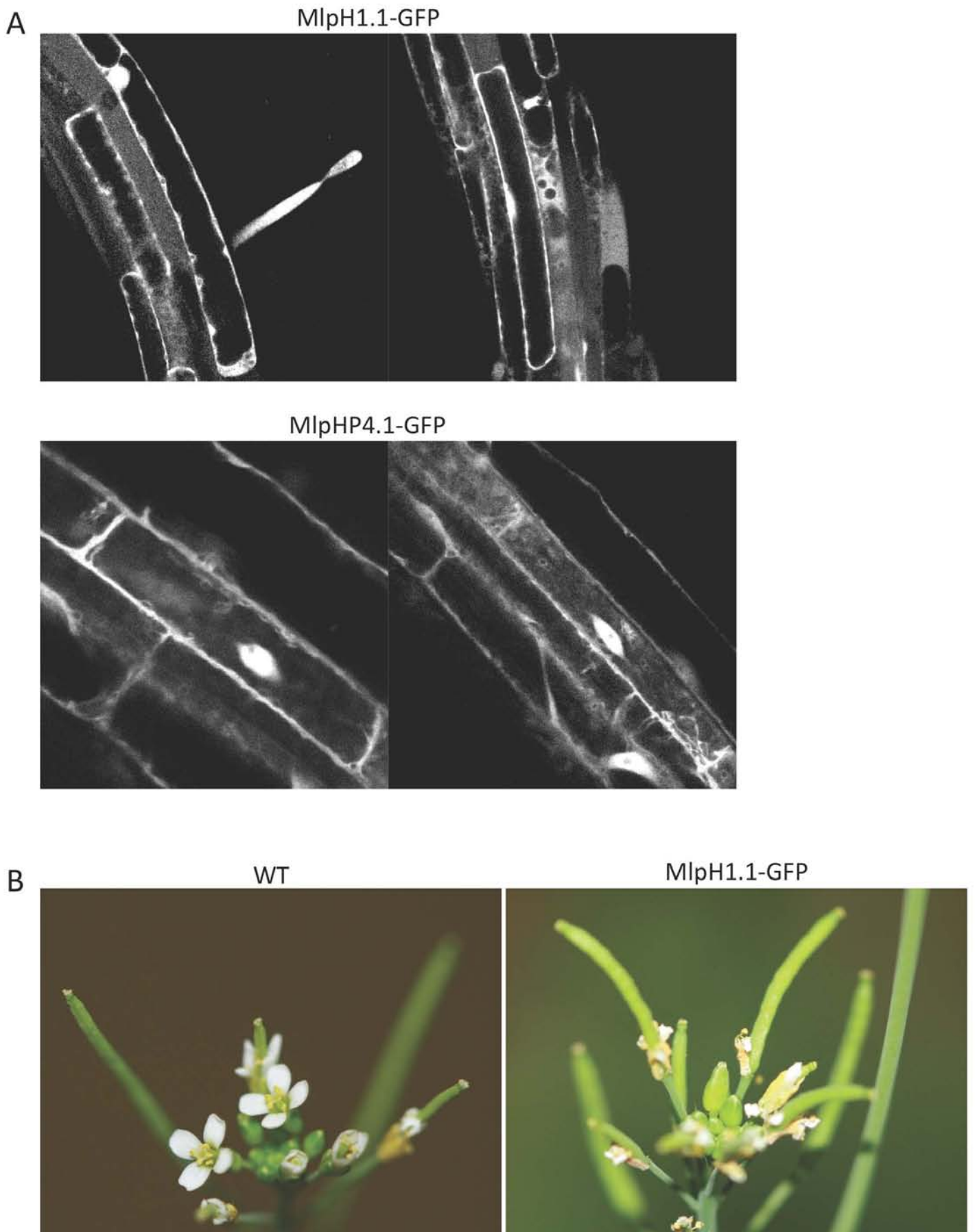


Figure S3

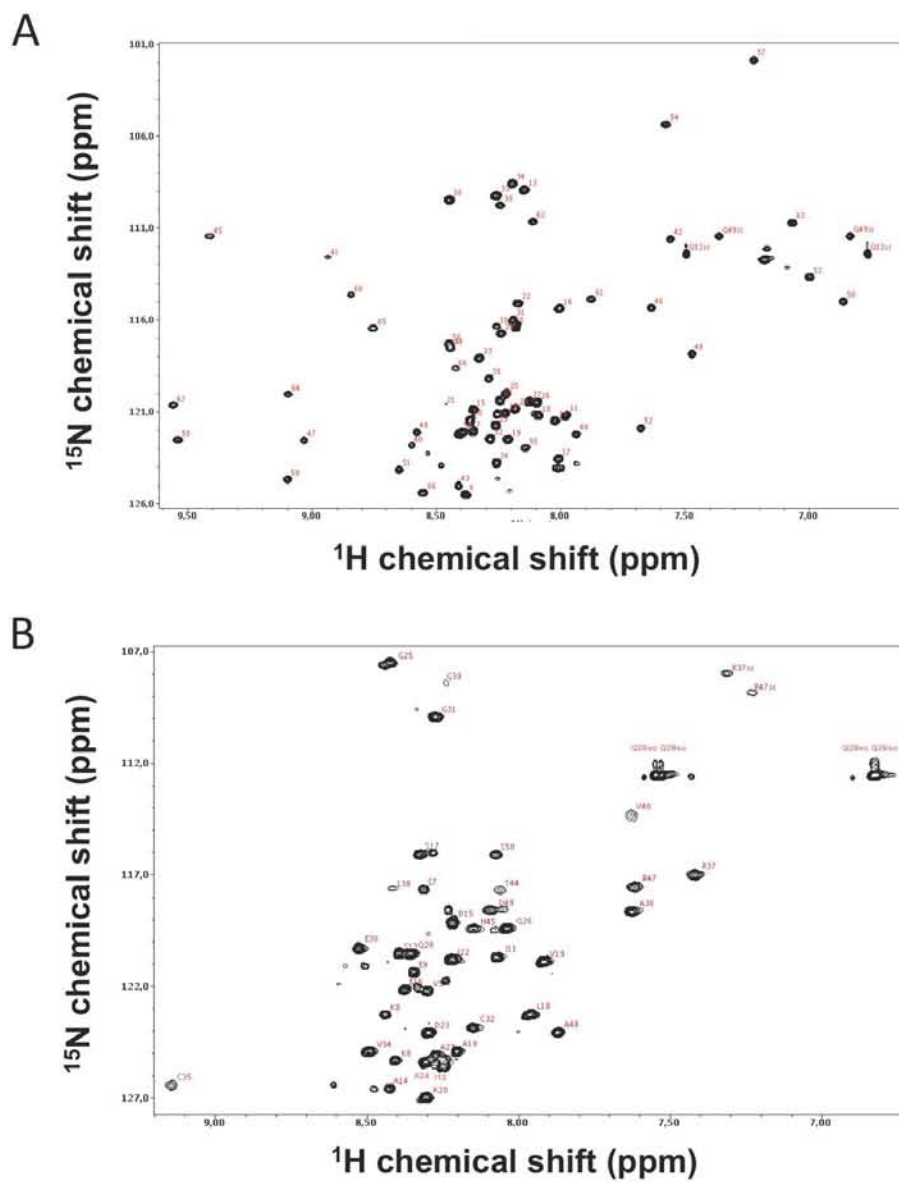
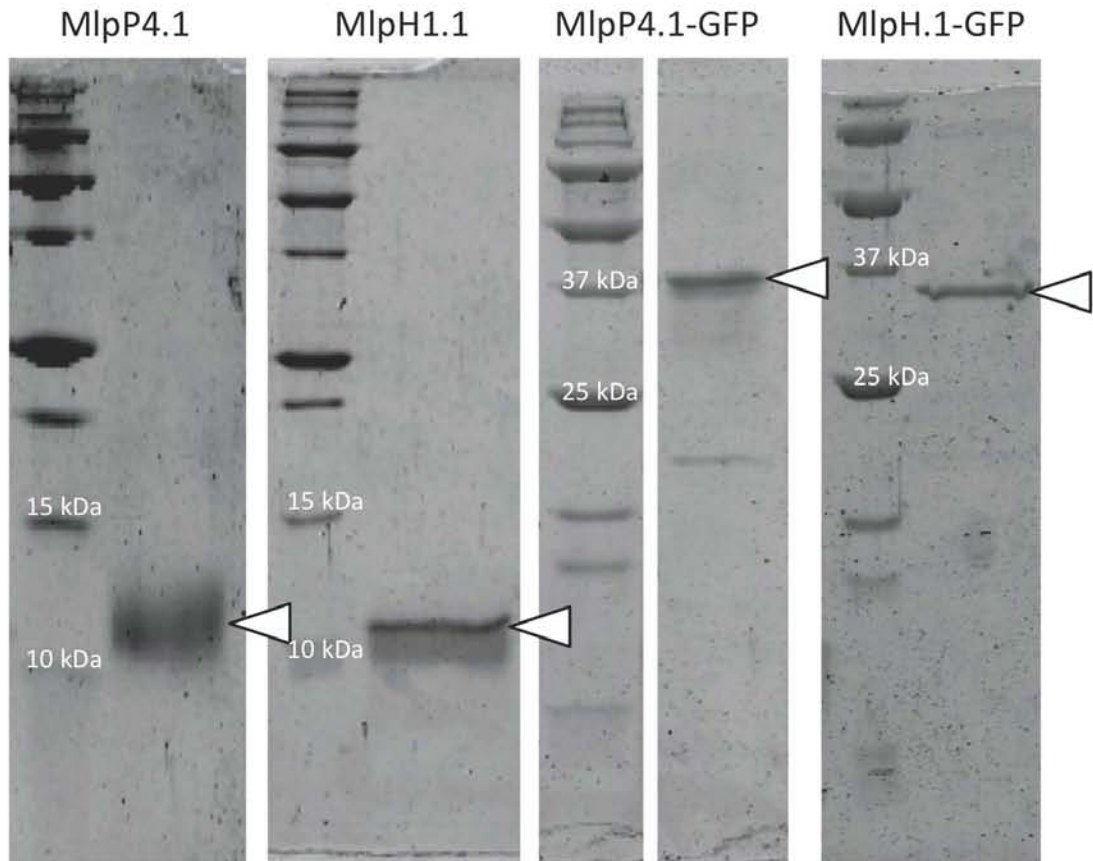


Figure S4



CHAPITRE VII

Discussion générale, conclusion et perspectives

Résumé du chapitre VII

Discussion générale, conclusion et perspectives

Dans ce dernier chapitre, je replace en premier lieu les questions majeures qui sont abordées dans le cadre de la thématique de recherche sur l'interaction entre peuplier et *M. larici-populina* au sein de l'UMR IAM. Ensuite, j'aborde et je mets en perspective quelques points de discussion que j'ai choisis au sein des articles présentés dans les chapitres précédents, et je montre dans quelle mesure les résultats obtenus permettent de progresser sur les questions posées. Du côté du peuplier, je discute notamment de l'induction du transporteur de sulfate PtSultr3;5 en réponse aux champignons biotrophes, ainsi que du rôle original que pourraient jouer certaines TLP chez le peuplier dans la réponse immunitaire. Concernant la protéine Risp, je propose un modèle mécanistique qui lui assigne une double fonction de peptide antimicrobien et d'éliciteur endogène des réactions de défense chez le peuplier. J'insiste sur le fait que ces deux fonctions n'ont jamais été clairement identifiées pour une même protéine chez les plantes. Du côté de *M. larici-populina*, je fais le bilan de la démarche d'identification et de caractérisation d'effecteurs candidats, ainsi que de l'identification de leurs cibles. J'insiste notamment sur la nécessité de mettre au point de nouveaux outils pour réaliser leur analyse fonctionnelle *in vivo* et sur les perspectives à court terme concernant leur caractérisation. Un article court (publié dans des actes de congrès) présenté en annexe de ce manuscrit discute de la manière dont les travaux qui sont réalisées sur le pathosystème peuplier-*M. larici-populina* au sein de l'UMR IAM et dans un cadre plus large au sein de l'INRA peuvent contribuer à définir des résistances plus durables chez les espèces de peuplier utilisées en plantations. Pour finir, j'intègre les principaux résultats que j'ai obtenus au cours de cette thèse dans le contexte plus global du projet de recherche de l'UMR IAM sur le pathosystème et de ses perspectives à moyen terme.

1. Questions et stratégie de recherche liées à l'étude du pathosystème peuplier/*M. larici-populina* au sein de l'UMR IAM

L'analyse moléculaire de l'interaction peuplier/*M. larici-populina* a particulièrement progressé au cours des cinq dernières années suite au séquençage des génomes des deux partenaires et grâce à l'analyse de leurs transcriptomes lors de l'interaction (Tuskan *et al.*, 2006 ; Duplessis *et al.*, 2011a ; Duplessis *et al.*, 2009 ; Hacquard *et al.*, 2011 ; Duplessis *et al.* 2011b ; Rinaldi *et al.* 2007 ; Figure 42). L'objectif principal des recherches conduites vise à identifier et à décrire les déterminants moléculaires qui accompagnent et permettent la mise en place d'une résistance au pathogène chez le peuplier et ceux qui conditionnent le succès de l'infection. En particulier, il s'agit de caractériser : i) les couples d'interaction R-Avr au sein du pathosystème, ii) des nouveaux composants du système immunitaire de l'hôte végétal et iii) des facteurs de virulence du champignon.

1.1. Bases moléculaires de l'interaction R - Avr

Les approches génétiques sont un outil particulièrement puissant pour l'identification de gènes de résistance ou d'avirulence. Ainsi, les premiers gènes de résistance à *M. larici-populina* ont récemment été identifiés par clonage positionnel chez le peuplier au sein d'unités de recherche INRA à Orléans et à Evry (Bresson *et al.*, 2011 ; Faivre-Rampant *et al.* non publié). En complément de ces approches, l'UMR IAM s'est investie dans l'analyse de l'évolution et de la diversification des familles de gènes codant des protéines de résistance (NB-LRR et RLP) au sein du génome de peuplier, afin d'avoir une vision globale des déterminants potentiels de la résistance aux parasites chez cet arbre (Kohler *et al.*, 2008 ; Petre *et al.*, en préparation, chapitre IV).

L'identification de gènes d'avirulence par des approches génétiques chez *M. larici-populina* reste difficile car le cycle biologique et la transformation du champignon ne sont pas maîtrisés en laboratoire. Chez d'autres parasites modèles, l'établissement de listes d'effecteurs candidats et des cribles réalisés *in planta* ont permis d'identifier rapidement des facteurs d'avirulence (Oh *et al.*, 2009). L'analyse du génome de *M. larici-populina* a permis de réaliser un large inventaire des effecteurs candidats (Hacquard *et al.*, 2012), toutefois, l'impossibilité d'exprimer à haut débit ces candidats chez le peuplier a limité l'identification de facteurs d'avirulence par une telle méthode. De manière alternative, il est aussi possible d'identifier des gènes d'avirulence chez les

champignons par des approche de génomique comparative et d'analyse de l'expression des transcrits (De Jonge *et al.*, 2012 ; Yoshida *et al.*, 2009). Au sein de l'UMR IAM, les génomes de 14 souches de *M. larici-populina* présentant des combinaisons de virulence différentes sur le peuplier ont été séquencés (projet ANR POPRUST, Duplessis *et al.* non publié). L'analyse comparative de ces génomes est en cours et devrait permettre d'identifier des gènes de virulence et d'avirulence candidats. De manière complémentaire, l'analyse de l'expression des gènes de *M. larici-populina* à des temps précoces d'infection par RNA-Seq pourrait permettre d'affiner la sélection des effecteurs candidats en ciblant ceux exprimés à des étapes cruciales de l'interaction, telles que la formation des premiers haustoria. L'analyse du transcriptome de l'interaction par pyroséquençage 454 à des temps précoces qui est présentée dans la chapitre II a montré qu'une grande profondeur de séquençage était nécessaire pour identifier les transcrits fongiques en plus grand nombre. Cette étude a donc constitué une étape préliminaire qui indique la nécessité de réaliser une analyse RNA-Seq sur la base d'autres approches, en utilisant par exemple la technologie Illumina (Petre *et al.*, 2012).

1.2. L'identification de nouveaux composants du système immunitaire végétal

Les déterminants moléculaires de la résistance des plantes aux parasites (récepteurs immunitaires, voies de signalisation, protéines de défense, ...) ont largement été décrits chez les plantes modèles annuelles telles qu'*A. thaliana* (Nishimura et Dangl 2010). Les études réalisées dans l'UMR IAM visent à déterminer les composants du système immunitaire qui sont partagés avec les plantes annuelles et à identifier d'éventuelles innovations chez le peuplier. Par exemple, l'annotation au sein du génome du peuplier de familles de gènes déjà connues pour leur rôle dans la reconnaissance des pathogènes ou dans la mise en place des réactions de défense chez les plantes, a permis de mettre à jour certaines spécificités comme par exemple la diversification des protéines NB-LRR ou des TLP (Kohler *et al.*, 2008 ; Petre *et al.*, 2011). D'autre part, la caractérisation fonctionnelle de protéines inconnues chez les autres plantes - comme Risp par exemple - a permis de décrire une innovation du peuplier (Petre *et al.*, en préparation, chapitres IV et V). Ce dernier exemple illustre parfaitement comment l'analyse de systèmes non modèles peut donner lieu à des découvertes originales, de manière complémentaire avec les analyses plus approfondies réalisées sur les modèles bien établis.

1.3. L'identification de facteurs de virulence du champignon

Il est très vraisemblable - et nous le suggérons fortement - que *M. larici-populina* déploie un grand nombre d'effecteurs au sein des tissus infectés afin de promouvoir sa virulence (Hacquard *et al.*, 2010 ; Hacquard *et al.*, 2012 ; Duplessis *et al.*, 2011). Classiquement, les activités de virulence des effecteurs peuvent être analysées par des approches génétiques (délétion affectant le phénotype de virulence du parasite) ou par l'expression spécifique *in planta* (phénotype de susceptibilité accrue de la plante ; Saitoh *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011). Les catalogues d'effecteurs candidats prédits au sein du génome de *M. larici-populina* (Hacquard *et al.*, 2012 ; Saunders *et al.*, 2012) constituent un socle de départ pour des analyses fonctionnelles. Cependant, comme précisé précédemment, l'absence d'outils d'analyse fonctionnelle au sein du pathosystème peuplier-*M. larici-populina* n'a pas permis d'engager des analyses *in vivo*. L'utilisation de systèmes hétérologues s'est révélée être une alternative pertinente afin de caractériser des activités de virulence d'effecteurs candidats (chapitre VI). En effet, des effecteurs candidats délivrés via le système de sécrétion de type III de *P. syringae* pv *tomato* dans les cellules foliaires d'*A. thaliana* est un système qui permet la mise en évidence d'activités de virulence à travers des gains de croissance bactérienne observés (Sohn *et al.*, 2007 ; Fabro *et al.*, 2011). Ce système a été développé par Hugo Germain dans le laboratoire d'Armand Séguin à Québec et a ainsi permis à ce jour de cribler près d'une vingtaine de candidats. Les membres des familles MlpH1 et MlpP4 que j'ai plus particulièrement étudié au cours de ma thèse ont été inclus dans cette série de criblage (chapitre VI). Bien que ces fonctions de virulence aient été définies en système hétérologue, il s'agit des premières rapportées pour des protéines de rouilles.

2. La description du transcriptome à des temps précoces d'interaction pour cribler des fonctions clés chez le peuplier et *M. larici-populina*

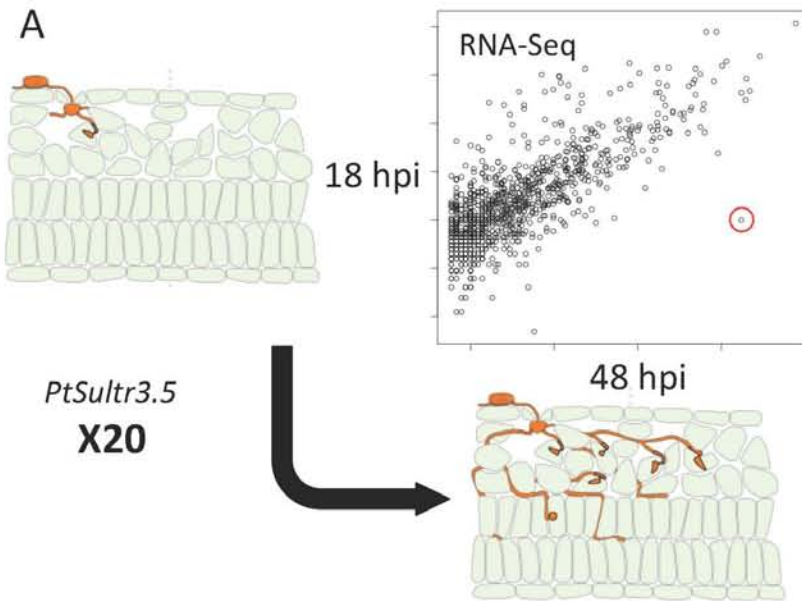
Avec le développement des nouvelles méthodes de séquençage, les approches de RNA-Seq sont en pleine expansion pour décrire d'une manière exhaustive les fonctions exprimées lors des interactions plante-parasite. Chez le peuplier, le transporteur de sulfate PtSultr3;5 est induit lors des interactions avec des champignons biotrophes et pourrait donc être impliqué dans la nutrition des parasites et/ou la perturbation de la physiologie au sein des tissus de l'hôte qui sont colonisés. Aux temps précoces d'infection des feuilles de peuplier, quelques transcrits de M. larici-populina codent des effecteurs potentiels qui sont des candidats pertinents pour être analysés en priorité.

2.1. Le RNA-Seq, une nouvelle approche pour analyser les interactions plante-parasite biotrophe

L'approche RNA-Seq qui consiste en un séquençage massif des ADNc générés à partir de transcrits (plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions de séquences produites) est en passe de devenir un outil incontournable pour décrire simultanément les reprogrammations génétiques d'un hôte et de son parasite en interaction (Westermann *et al.*, 2012). Un nombre croissant d'études utilise cette approche pour décrire spécifiquement l'expression des gènes de parasites lors de l'infection (Kemen *et al.*, 2011 ; Tisserant *et al.*, 2011 ; Kleemann *et al.*, 2012 ; Wessling *et al.*, 2012) mais l'analyse simultanée des deux partenaires reste encore très rare (Fernandez *et al.*, 2012 ; Petre *et al.*, 2012). Au sein du pathosystème peuplier/*M. larici-populina*, les temps précoces d'infection correspondent à une étape clef où se joue l'issue de l'interaction, mais qui reste encore assez peu décrite (Rinaldi *et al.*, 2007 ; Duplessis *et al.*, 2009 ; Duplessis *et al.*, 2011b). L'analyse du transcriptome par pyroséquençage 454 à des temps précoces de l'interaction n'a pas permis de saturer le transcriptome du peuplier, limitant de fait les analyses quantitatives à un nombre restreint de gènes (Petre *et al.*, 2012). De même, très peu de transcrits fongiques ont été identifiés, de l'ordre de moins de un pour mille par rapport aux transcrits végétaux. Malgré cela, quelques données intéressantes ont pu être mises à jour par cette analyse.

2.2. PtSultr3;5, du sulfate pour les biotrophes associés au peuplier ?

Aux temps précoces d'interaction peuplier/*M. larici-populina*, le transcriptome de la plante reste relativement stable, bien que l'on ne puisse exclure des régulations non détectables à une échelle plus localisée comme cela a été montré dans d'autres pathosystèmes (Chandran *et al.*, 2009). Dans notre étude, le gène *PtSultr3;5* codant un transporteur de sulfate est le seul dont l'expression est fortement induite dans les feuilles suite à la colonisation par le champignon (Figure 48A ; Petre *et al.*, 2012). Ce transcrit est également parmi les plus induits dans des racines de peuplier lors d'un contact indirect avec *L. bicolor* en système *in vitro* (Figure 48B). Dans ce cas précis, il a été suggéré qu'un signal mobile du champignon pourrait être responsable de la reprogrammation génétique observée chez le peuplier, selon des mécanismes impliquant l'auxine (Felten *et al.*, 2009). De manière intéressante, *PtSultr3;5* est l'orthologue de SST1 (symbiotic sulfate transporter 1), un transporteur de sulfate du Lotier du Japon (*Lotus japonicus*) nécessaire au fonctionnement des symbioses fixatrices



PtSultr3.5
X20

B



PtSultr3.5
X25

C

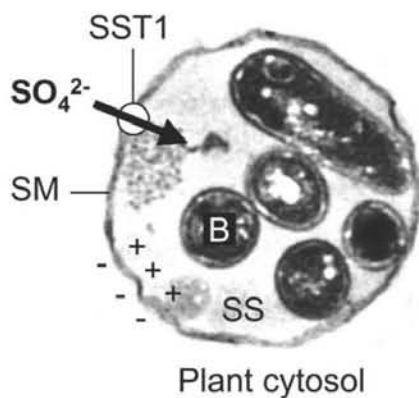


Figure 48. Un transporteur de sulfate de peuplier et des effecteurs candidats de *M. laricipopulina* exprimés

(A) Le transcriptome du peuplier reste relativement stable entre 18 et 24 heures post-inoculation (hpi) et 18 et 48 hpi dans le cadre des interactions incompatible et compatible, respectivement, comme mesuré par pyroséquencage 454 des ADNc de feuilles de peuplier infectées (RNA-Seq, expression logarithmique des 1042 gènes les plus exprimés), excepté pour le gène PtSultr3.5 (Poptr_0006s16150, marqué par un cercle rouge) dont l'expression est fortement induite par la colonisation du champignon. (B) Ce gène est également parmi les plus induits dans les racines de peuplier en réponse à un contact indirect avec *L. bicolor in vitro*. (C) PtSultr3.5 code un transporteur de sulfate, homologue du transporteur SST1 (symbiotic sulfate transporter 1) de *Lotus japonicus*. Krusell et collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel SST1 est impliqué dans le transport de sulfate depuis le cytoplasme de la plante vers le bactéroïde (SM : symbiosome membrane ; SS : symbiosome space ; B : bacteroids).

Adapté de Hacquard, Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, 2010 / Petre et al., PLoS ONE, 2012 / Krusell et al., The Plant Cell, 2005 / photo de J. Felten.

d'azote. L'identification de SST1 au sein des membranes du péribactéroïde a permis de proposer un modèle où SST1 fonctionne dans l'export de sulfate vers les symbiontes (Figure 48C ; Krusell *et al.*, 2005). Globalement, ces observations suggèrent que PtSultr3;5 pourrait également être impliqué dans l'apport de sulfate aux biotrophes associés au peuplier. Bien que les voies métaboliques d'assimilation du sulfate soit partiellement ou complètement perdues chez plusieurs biotrophes obligatoires, ces composants sont présents chez *M. larici-populina*, à l'exception d'un domaine transkétolase absent pour la sous-unité β de la sulfite réductase (Spanu 2012 ; Duplessis *et al.*, 2011a). Par ailleurs, trois transporteurs de sulfate sont présents chez *M. larici-populina*, dont deux sont exprimés durant l'interaction (Duplessis *et al.*, 2011b). L'analyse de la capacité de mutants de peuplier n'exprimant plus PtSultr3;5 à interagir avec *L. bicolor* ou *M. larici-populina* serait une expérience clef pour évaluer l'importance de cette protéine lors des interactions avec des microorganismes biotrophes chez le peuplier, et préciser son rôle dans la résistance ou la susceptibilité de l'arbre.

2.3. Des effecteurs candidats exprimés précocement *in planta*

Parmi les 40 transcrits fongiques les plus abondants identifiés aux temps précoces de l'infection, la moitié (19) code des SSP (Petre *et al.*, 2012). La majorité de ces SSP ne possède pas de domaines connus et représente de possibles effecteurs candidats. Par exemple, SSP15 est une protéine de 123 acides aminés qui a été immunolocalisée au niveau des haustoria dans les feuilles de peuplier infectées (Hacquard *et al.*, 2012). L'expression de SSP15 est induite très précocement et présente un pic d'expression à 12 hpi. D'autre part, les transcrits du gène *Mlp-95625* qui code une petite protéine de 95 acides aminés avec un domaine inositol polyphosphate-1-phosphatase conservé sont représentés par un nombre important de lecture (36 lectures, soit presque 20 % du total des lectures correspondant à des SSP). Considérant que plusieurs effecteurs d'eucaryotes interagissent avec les phosphatidylinositol phosphates (Kale *et al.*, 2010 ; Gan *et al.*, 2010 ; Yaeno *et al.*, 2011), la présence d'un domaine impliqué dans la modification de certains de ces groupements au sein d'une petite protéine sécrétée est particulièrement intéressante. SSP15 et *Mlp-95625* représentent donc d'excellents effecteurs candidats à intégrer en priorité dans le processus d'analyse fonctionnelle déjà engagé pour MlpP4.1 et MlpH1.1 (Chapitre VI). Chez *P. sojae*, les effecteurs exprimés très précocement lors de l'infection du soja jouent souvent un rôle de facteurs de virulence qui inhibent l'ETI (Wang *et al.*, 2011 ; Jiang et Tyler 2012). Il serait intéressant de tester

si ces effecteurs candidats de *M. larici-populina* peuvent inhiber l'ETI dans des systèmes hétérologues. Des approches de RNA-Seq basées sur la technologie Illumina (voir plus haut dans ce chapitre) sont déjà engagées, ce qui devrait permettre à très court terme d'étoffer et de finaliser la liste des effecteurs candidats exprimés de façon précoce au cours de l'interaction ([Projet ANR POPRUST](#), Duplessis *et al.* non publié).

3. Les TLP, agents de la défense pré-invasive

Beaucoup de TLP ne sont pas systématiquement induites en réponse aux stress chez les plantes, mais s'accumulent au cours du développement d'organes tels que les fruits, constituant des défenses pré-invasives contre les parasites. Au cours de l'évolution, certains gènes TLP ont fusionné avec un domaine codant une protéine kinase cytoplasmique, générant ainsi un récepteur membranaire potentiellement impliqué dans la résistance des plantes aux parasites.

3.1. Les TLP des fruits : des édulcorants antimicrobiens

La famille des gènes TLP a subi une très forte expansion au cours de l'évolution des plantes, qui culmine chez le peuplier avec plus de 40 gènes ([Figure 49A](#) ; [Liu *et al.*, 2011](#) ; [Petre *et al.*, 2011](#)). Le fait que la sélection naturelle ait favorisé les individus porteurs d'un si grand nombre d'isoformes au cours de l'évolution suppose des spécificités de fonction ou de localisation. De manière surprenante, les fonctions rapportées pour les TLP ne corrèlent pas avec leur phylogénie, suggérant une multifonctionnalité universelle et des spécificités plutôt associées à une localisation dans différents tissus et organes des plantes. D'une manière générale, beaucoup de TLP sont accumulées dans les fruits charnus (cerise, banane, pomme, poire, pêche, raisin, poivron, ...). Dans les raisins ou les poivrons, cette accumulation est graduelle et corrèle avec la maturation des fruits ([Tattersall *et al.*, 1997](#) ; [Salzman *et al.*, 1998](#) ; [Kim *et al.*, 2002](#)). Les TLP sont, avec certaines chitinases, les protéines les plus abondantes identifiées dans le vin ou le jus de raisin, ce qui souligne la très forte accumulation dans les raisins mûrs ([D'Amato *et al.*, 2010](#) ; [Le Bourse *et al.*, 2011](#)). Les TLP des fruits présentent des activités glucanases et antimicrobiennes tout comme la plupart des TLP caractérisées à ce jour ([Menu-Bouaouiche *et al.*, 2003](#)). Considérant le pouvoir sucrant des TLP, on peut suggérer que ces protéines contribuent au goût sucré des fruits, augmentant de ce fait leur attractivité pour les animaux et donc la probabilité de dispersion des graines. Dans le même temps,

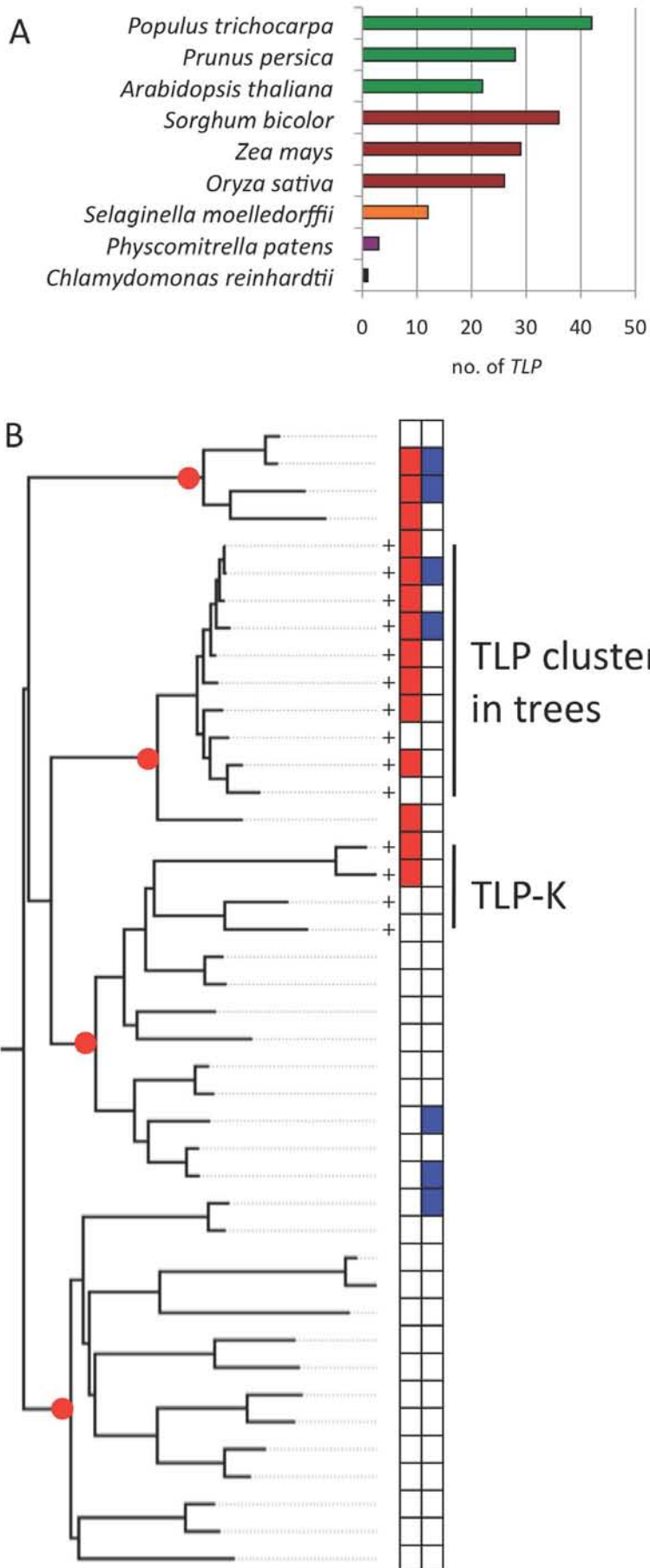


Figure 49. Evolution et diversification des thaumatin-like proteins (TLP) en famille multigénique chez le peuplier

(A) Le nombre de gènes codant des TLP au sein de génomes représentatifs de plantes est présenté. En noir, l'algue verte unicellulaire *C. reinhardtii* ; en violet, la mousse *P. patens* ; en orange le trachéophyte *S. moellendorffii* ; en brun, les monocotylédones *O. sativa* (le riz), *Z. mays* (le maïs) et *S. bicolor* (le sorgho) ; en vert les angiospermes *A. thaliana*, *P. persica* (le pêcheur) et *P. trichocarpa* (le peuplier). (B) Arbre phylogénétique construit à partir des 42 TLP identifiées au sein du génome de *P. trichocarpa* (cf. Figure 1, chapitre III). Les points rouges indiquent les quatre clades. Les symboles '+' indiquent les signatures d'évolution sous sélection positive, les cases rouges indiquent une induction lors d'un stress biotique (ici, infection par *M. larici-populina*) et les cases bleues une régulation lors d'un stress abiotique. TLP-K: TLP-kinase.

Adapté de Petre et al., BMC Plant Biology, 2011 / Petre et al., 'Actes du séminaire de l'école doctorale RP2E', 2011 / Zhao et Su 2010

leur activité antimicrobienne en ferait des agents préventifs de défense des organes reproducteurs.

3.2. Les TLP-K : une évolution de la défense vers la reconnaissance des parasites ?

Chez certaines plantes, des gènes *TLP* ont fusionné avec un gène codant un domaine kinase pour coder des TLP-K membranaires, avec un domaine thaumatine extracellulaire et un domaine kinase cytoplasmique (Wang *et al.*, 1996). Une TLP-K d'arabidopsis confère une résistance accrue au champignon *Sclerotinia homeocarpa* quand elle est exprimée dans *Agrostis palustris*, ce qui suggère une fonction de récepteur du système immunitaire impliqué dans la résistance aux parasites (Guo *et al.*, 2003). Chez le peuplier, 4 *TLP-K* ont été identifiés, qui présentent des signatures d'évolution sous sélection positive et dont certains sont régulés lors des infections par *Melampsora* spp. (Figure 49B ; Zhao et Su 2010 ; Petre *et al.*, 2011). De manière intéressante, deux TLP-K ont été identifiées au sein du locus MXC3 de résistance à *Melampsora columbiana* chez *P. trichocarpa*, conjointement avec quatre autres PRR de type LRR-RLK ou LRR-RLP (Yin *et al.*, 2004). Cela suggère que chez le peuplier, les TLP-K pourraient être impliquées dans la reconnaissance de *Melampsora* spp. et la mise en place de la résistance de l'arbre au champignon. Bien que cela reste à démontrer, les TLP-K pourraient ainsi constituer une nouvelle classe de PRR ou de protéines de résistance ayant vraisemblablement évolués à partir de protéines de défense antimicrobiennes (Tör *et al.*, 2009). D'autres protéines de défense comme certaines PR1 ou PR3 adoptent également cette organisation de type récepteur membranaire avec un domaine kinase cytoplasmique, ce qui suggère que l'évolution des protéines de défense vers des fonctions de reconnaissance pourrait être un mécanisme fréquent chez les plantes (Van Loon *et al.*, 2006).

4. Risp: un peptide de défense multifonctionnel du peuplier

L'analyse fonctionnelle de la protéine Risp, essentiellement basée sur la caractérisation de la protéine recombinante, a révélé une dualité fonctionnelle avec une activité antimicrobienne dirigée contre M. larici-populina et la capacité à éliciter des réponses de défense chez le peuplier. La combinaison de ces deux fonctions au sein d'une même protéine est classiquement observée chez les mammifères mais n'a encore jamais été clairement démontrée chez les plantes.

4.1. Risp, une nouvelle protéine antifongique

La protéine recombinante Risp a la capacité de se fixer aux spores de *M. larici-populina* et d'inhiber la croissance du champignon *in vitro* et *in vivo* (Petre *et al.*, en préparation, chapitre V ; Figure 50). Ces propriétés sont typiquement observées pour les protéines et peptides antimicrobiens (Zasloff *et al.*, 2002). On compte classiquement chez les plantes six classes de peptides antimicrobiens ainsi que plusieurs types de protéines ayant ces activités (Hammami *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2008). Risp ne possède pas d'homologues chez les autres plantes et ne présente aucune homologie même partielle avec des protéines antimicrobiennes, constituant donc une nouvelle classe de protéines antifongiques chez les plantes. A ce titre, sa structure intrinsèquement désordonnée est également originale en comparaison des structures rigides généralement rapportées pour les protéines antimicrobiennes de plantes (Sels *et al.*, 2008 ; Pelegriani *et al.*, 2011). La résolution de la structure tridimensionnelle de Risp lorsque qu'elle est fixée aux spores de *M. larici-populina*, par une approche de RMN du solide devrait permettre d'identifier le(s) mécanisme(s) permettant à Risp de fonctionner à la manière d'un peptide antifongique.

4.2. Risp, un nouvel éliciteur endogène des réponses de défense des plantes

Un gène *RLP* est physiquement associé au gène *Risp* au sein du génome de *P. trichocarpa*, ce qui nous a amené à suggérer que Risp pourrait avoir un rôle d'éliciteur endogène des réponses de défense, via une interaction avec le produit du gène *RLP* associé. L'ajout de Risp recombinante à des concentrations sub-micromolaires dans des cultures cellulaires de peuplier a permis de révéler une alcalinisation du milieu, traduisant une induction des réponses de défense et confortant l'hypothèse d'une fonction d'éliciteur endogène (Petre *et al.*, en préparation, chapitre IV). Risp ne présente aucune homologie avec les membres des six classes d'éliciteurs endogènes actuellement connus, qui sont tous de très petits peptides issus de précurseurs n'ayant pas de fonctions connues dans l'immunité (Yamaguchi et Huffaker 2011 ; Yamaguchi *et al.*, 2011). Le fait que la protéine Risp du peuplier ne soit pas détectée lors des réponses de défense dans les feuilles alors que l'expression du gène est très fortement induite, suggère qu'elle pourrait être dégradée ou clivée, libérant alors potentiellement un peptide bioactif jouant le rôle d'éliciteur. Récemment, Guo et collaborateurs ont incubé des précurseurs recombinants dans des extraits de protéines solubles de plantes afin de mettre en évidence le clivage de ces précurseurs et la libération de peptides éliciteurs bioactifs

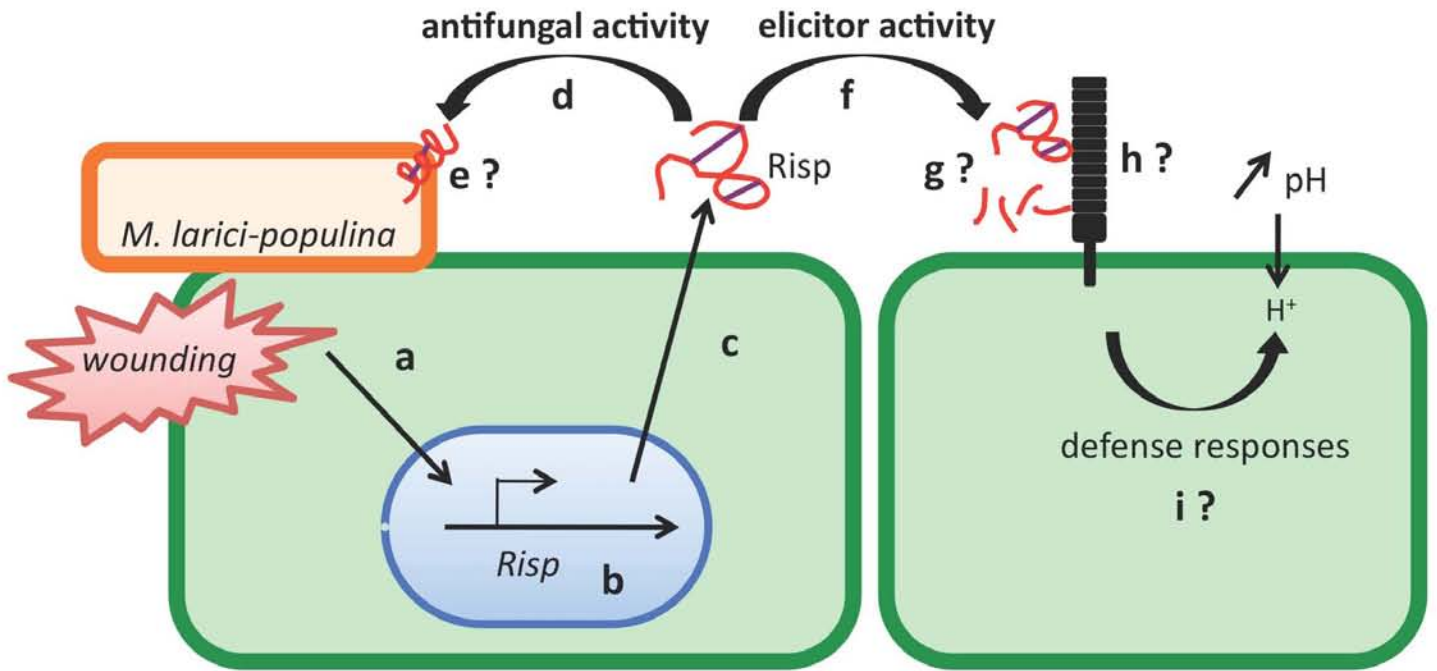


Figure 50. Modèle illustrant le rôle de Risp dans l'immunité du peuplier

Suite à une infection par *M. larici-populina* ou à une blessure (a), l'expression du gène *Risp* est induite (b). Cela mène à la production et à la sécrétion dans l'apoplaste de Risp (en rouge) (c) qui présente un état intrinsèquement désordonné malgré la présence de 2 ponts disulfure (en violet). Risp interagit avec *M. larici-populina* et inhibe sa croissance (d) probablement en perméabilisant les membranes où la protéine se structurerait en hélices alpha (e). Risp élicite également des réponses de défense (f) *in planta*. Risp est potentiellement clivée *in planta* (g) et la protéine (mature ou clivée) est peut-être reconnue par un récepteur membranaire de type RLP (h). Les réponses de défense ont été quantifiées à l'aide de tests d'alcalinisation de cultures cellulaires, mais d'autres méthodes devront valider ces observations (i). Les points d'interrogation marquent les aspects du modèle qui nécessitent encore d'être confirmés et qui sont discutés dans le texte.

(Guo *et al.*, 2011). Une telle approche pourrait être envisagée pour déterminer si Risp est réellement clivée par des protéines de peuplier, et si oui pour identifier par spectrométrie de masse le peptide ainsi libéré. D'autre part, l'interaction de Risp avec un récepteur RLP pourrait être testée par une approche *a priori* en ciblant le RLP physiquement associé à Risp chez *P. trichocarpa*. Nous avons cloné le domaine LRR extracellulaire de ce RLP et tenté de le produire de manière recombinante dans *E. coli* sans succès (les domaines LRR sont connus pour être récalcitrants à une expression hétérologue en bactéries). Alternativement, ce RLP pourrait être exprimé en tabac ou chez arabidopsis afin d'observer si les plants l'exprimant peuvent acquérir la capacité de reconnaître Risp. Ce type d'expérience présente cependant une forte probabilité d'échec car les récepteurs membranaires sont souvent non-fonctionnels chez des plantes de familles taxinomiques éloignées, probablement à cause de l'altération des processus de modification post-traductionnelle (Nekrasov *et al.*, 2009). Quelques exemples de succès pour une telle approche existent cependant (Lacombe *et al.*, 2010 ; De Jonge *et al.*, 2012).

4.3. Risp, un peptide de défense multifonctionnel chez les plantes

Les peptides multifonctionnels ou HDP (host defense peptides) sont bien caractérisés chez les animaux, chez qui ils luttent directement contre les infections, à la manière des peptides antimicrobiens, et indirectement, à la manière des éliciteurs endogènes de l'immunité (Hancock et Sahl 2006). Grâce à cette dualité fonctionnelle, les HDP font l'objet de nombreuses applications thérapeutiques (Yeung *et al.*, 2011). Chez les plantes, plusieurs protéines de défense semblent conférer des tolérances à certains stress via une modulation de la physiologie de la plante lors de surexpression ectopique (Lee *et al.*, 2011 ; El-kereamy *et al.*, 2011). Cependant, à l'heure actuelle, aucune démonstration directe de l'existence d'HDP chez les plantes n'a été apportée. A ce titre, Risp représente la première molécule végétale de ce type. A l'instar des mammifères, des HDP chez les plantes peuvent potentiellement faire l'objet d'applications sanitaires.

5. Identification et analyse des effecteurs de *M. larici-populina* : développement d'outils pour réaliser l'analyse fonctionnelle *in vivo*

Une démarche post-génomique de l'analyse des effecteurs de parasites et de leurs cibles a été proposée et schématisée par Alfano (Alfano 2009 ; Figure 51). Les trois étapes successives de cette démarche sont i) l'identification d'un répertoire d'effecteurs chez un parasite, ii) la caractérisation de ces effecteurs et l'identification de leurs cibles in planta, et enfin iii) la caractérisation de leurs cibles. Cette approche est actuellement suivie au sein

de l'UMR IAM pour les effecteurs de *M. larici-populina*. Le manque d'outils et la difficulté à en développer sur le pathosystème peuplier-*M. larici-populina* pour réaliser l'analyse fonctionnelle des effecteurs nous a conduit à cibler des systèmes hétérologues.

5.1. *M. larici-populina*, un modèle émergent pour l'étude de la biologie des rouilles fongiques et de la biotrophie

Historiquement, l'analyse moléculaire des agents des rouilles fongiques s'est essentiellement concentrée sur les modèles *M. lini* et *U. fabae* (Hahn et Mendgen 1997 ; Voegelé *et al.*, 2009). *M. lini* a été le modèle d'étude sur lequel Harold Flor a établi le concept de relation gène-pour-gène (Flor 1971). L'analyse des déterminants moléculaires de *M. lini* a ensuite permis l'identification des quatre seuls effecteurs clairement établis chez les rouilles aujourd'hui (Ellis *et al.*, 2007). L'analyse moléculaire d'*U. fabae* a permis de démontrer pour la première fois chez un champignon la translocation d'une protéine sécrétée à l'intérieur des cellules de plante (Kemen *et al.*, 2005). C'est également chez ces champignons que les haustoria, leur fonction dans la nutrition des parasites (Voegelé *et al.*, 2001 ; Mendgen et Hahn 2002) et dans la sécrétion des effecteurs (Catanzariti *et al.*, 2006 ; Rafiqi *et al.*, 2010 ; Duplessis *et al.* 2012) sont les plus étudiés. Le séquençage et l'analyse du génome de *M. larici-populina* a constitué la première analyse génomique d'un agent de rouille, conjointement avec *P. graminis* f. sp. *tritici* (Duplessis *et al.*, 2011a). La disponibilité de cette séquence a permis de décrire les nombreuses familles de gène codant des effecteurs candidats (Hacquard *et al.*, 2012 ; Saunders *et al.*, 2012), des transporteurs vraisemblablement impliqués dans la nutrition du champignon (Duplessis *et al.*, 2011a), ainsi que la régulation de ces gènes lors des différentes étapes de l'infection (Joly *et al.*, 2010 ; Hacquard *et al.*, 2010 ; Duplessis *et al.*, 2011b). Le développement d'outils pour l'analyse fonctionnelle de ces fonctions *in planta* reste une priorité pour dépasser les phases descriptives de transcriptomique et permettre des avancées significatives dans la compréhension mécanistique des parasites biotrophes et de leurs effecteurs.

5.2. Un répertoire de plusieurs centaines d'effecteurs candidats

Peu de catalogues d'effecteurs candidats ont été établis pour des champignons biotrophes, dont *U. maydis*, *B. graminis*, *F. graminearum* ou encore *C. higginsianum* (Mueller *et al.*, 2008 ; Spanu *et al.*, 2010 ; Brown *et al.*, 2012 ; O'Connell *et al.*, 2012). Le génome de *M. larici-populina* a été analysé en détail afin d'établir un tel répertoire de gènes candidats. Considérant que la majorité des effecteurs connus chez les

champignons sont des SSP, une attention particulière a été portée sur les gènes codant ces SSP (Stergiopoulos et De Wit 2009). En combinant l'analyse des signatures de sélection positive parmi des familles de gènes paralogues, les motifs et/ou la richesse en cystéines, les profils d'expression et l'homologie avec des effecteurs connus, il a été possible de dresser les premiers catalogues d'effecteurs candidats chez les rouilles fongiques (Hacquard *et al.*, 2012 ; Saunders *et al.*, 2012). Dans un futur proche, l'analyse comparative des génomes de différentes souches de *M. larici-populina* porteuses de combinaisons de virulence distinctes pour identifier du polymorphisme au sein des séquences de gènes d'effecteurs candidats (approche de génétique d'association) devrait permettre de dresser de nouvelles listes d'effecteurs candidats présentant des signatures de co-évolution avec l'hôte.

Dans le futur, il sera nécessaire de développer et systématiser les cribles *in planta* pour mieux cibler les candidats d'intérêt, quitte à utiliser des systèmes hétérologues. Par exemple, des cribles de localisation pourront être réalisés sur tabac, comme cela a été réalisé récemment pour des effecteurs candidats d'oomycètes (Schornack *et al.*, 2010 ; Caillaud *et al.*, 2012). Ces approches ont révélé qu'un nombre important d'effecteurs candidats d'oomycètes sont localisés au niveau du noyau, ce qui suggère une possible manipulation des programmes génétiques de l'hôte. Chez *M. lini*, les quatre effecteurs connus, exprimés en tabac, sont localisés dans le cytoplasme (AvrM, AvrL567 et AvrP4) ou au niveau du noyau pour AvrP123 (Duplessis *et al.*, 2012 ; Rafiqi *et al.*, 2012). Bien que le tabac soit une espèce non-hôte pour *M. larici-populina*, de récentes études suggèrent que certains jeux d'effecteurs de parasites différents ciblent des protéines végétales conservées (Mukthar *et al.*, 2011) et pourraient ainsi présenter des activités de virulence au sein de plantes non-hôtes (Fabro *et al.*, 2011). A la lumière de ces observations, un criblage de la localisation des effecteurs candidats de *M. larici-populina* en tabac semble être une stratégie réalisable à haut-débit, ce qui permettrait par exemple d'identifier des protéines localisant dans les noyaux ou encore prenant part aux réponses de défense focalisées dans les cellules accommodant des haustoria.

5.3 Les apports de l'analyse des protéines recombinantes MlpP4.1 et MlpH1.1

5.3.1. Le domaine N-terminal de MlpP4.1 : un adaptateur flexible pour interagir avec des partenaires ?

Les analyses d'effecteurs recombinants ont permis des avancées majeures pour comprendre comment ces protéines interagissent avec leur cible, localisent ou

pénètrent dans les cellules hôtes (Wang *et al.*, 2007 ; Catanzariti *et al.*, 2010 ; Kale *et al.*, 2010 ; Leonelli *et al.*, 2011 ; encadré 3). Afin de préciser les rôles joués par MlpP4.1 et MlpH1.1 dans l'interaction avec le peuplier, nous avons utilisé différentes approches proposées par Alfano en 2009 (Figure 51). En particulier, nous avons produit des protéines recombinantes et initié leur caractérisation biochimique et structurale. La résolution des structures tridimensionnelles de MlpP4.1 et MlpH1.1 est bien engagée et devrait aboutir à court terme. L'analyse des séquences protéiques au sein des familles MlpP4 et MlpH1, particulièrement l'identification d'acides aminés polymorphes sous pression de sélection, est un support pertinent pour détailler la répartition des résidus au sein des structures des protéines qui seront générées. En effet, les résidus polymorphes et situés sur les surfaces exposées des protéines sont souvent déterminants pour l'interaction avec des partenaires protéiques, cibles de virulence ou récepteurs du système immunitaire (Wang *et al.*, 2007 ; Chou *et al.*, 2011 ; Leonelli *et al.*, 2011). La connaissance des cibles de virulence pourra également permettre de mieux comprendre comment ces protéines interagissent entre elles. Enfin, les résidus cystéinyles sont fortement conservés au sein des familles MlpP4 et MlpH1. Dans le cas de MlpP4.1, ces cystéines sont impliquées dans la formation de ponts disulfure, formant vraisemblablement un motif cystine-knot qui est typique de certains effecteurs extracellulaires comme Avr9 de *C. fulvum* et qui confère en général une très forte stabilité à la région protéique le contenant (Van Der Hooven *et al.*, 2001 ; Guo et Clark 2011). La flexibilité de la partie N-terminale de MlpP4.1 contraste avec la vision d'une protéine extrêmement stable. De tels domaines N-terminaux flexibles ont également été observés chez les effecteurs AvrL567 et AvrM de *M. lini* (Wang *et al.*, 2007 ; Catanzariti *et al.*, 2010). Cette région étant importante pour la translocation de ces deux effecteurs dans les cellules de plantes, et sachant que les domaines désordonnés sont souvent impliqués dans la reconnaissance de molécules partenaires, il est tentant de suggérer que ces domaines flexibles puissent être impliqués dans la reconnaissance de partenaires pour permettre l'entrée dans les cellules de l'hôte.

5.3.2. L'utilisation des protéines recombinantes pour identifier des partenaires protéiques in vitro

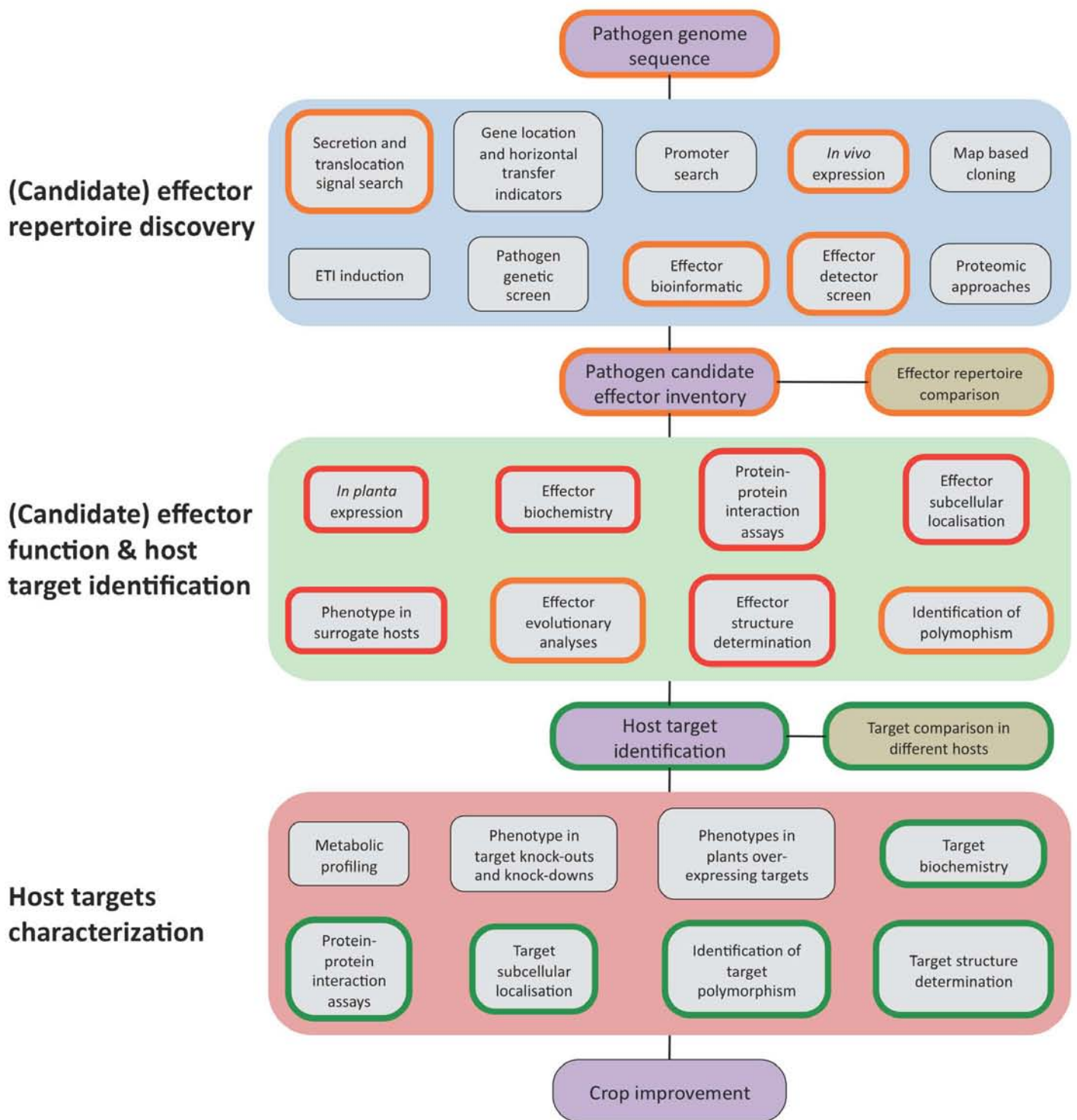


Figure 51. Feuille de route pour la caractérisation et l'identification des effecteurs et de leurs cibles
 Représentation schématique de la démarche d'identification des effecteurs ou effecteurs candidats (boîte bleu), de leurs fonctions et de leurs cibles (boîte verte) et la caractérisation de ces cibles (boîte rouge). Les étapes clés permettant d'engager, de faire progresser et de valoriser cette démarche sont en violet. La confrontation des données récoltées avec celles issues d'autres modèles biologiques est indiquée en brun. Les objets en gris indiquent les différentes approches qui peuvent être utilisées à chaque étape. Encadrés oranges : approches effectuées chez *M. larici-populina* ; encadrés rouges : approches effectuées ou en cours sur *M. larici-populina* pour lesquelles j'ai pu contribuer ; encadrés verts : approches réalisables à moyen terme au sein de l'UMR IAM.
 Adapté de Alfano, MPP, 2009

L'expression transitoire d'effecteurs *in planta* est une méthode de choix pour identifier des complexes de protéines ciblées (Bozkurt *et al.*, 2011). Dans la mesure où l'expression transitoire par agro-infiltration n'est pas encore maîtrisée pour le peuplier, l'utilisation de protéines recombinantes s'est révélée utile pour identifier des partenaires *in vitro*, par chromatographie d'affinité suivie d'analyses par spectrométrie de masse. Cette approche a été utilisée auparavant avec succès au sein de l'UMR IAM, pour identifier des partenaires d'oxydoréductases (Balmer *et al.*, 2003 ; Rouhier *et al.*, 2005). Plusieurs partenaires intéressants et spécifiques de MlpP4.1 ou de MlpH1.1 ont été identifiés. Il s'agit notamment de protéases et d'oxydoréductases. Le croisement de cette approche par chromatographie d'affinité avec des méthodes complémentaires (système de levure double hybride ou d'interactions entre protéines recombinantes) devrait rapidement permettre de valider ou d'invalider certains des partenaires candidats identifiés. Suivant les mêmes approches de localisation et de caractérisation des protéines recombinantes, il sera possible dans un second temps de caractériser ces cibles (Figure 51).

6. Conclusion

Depuis le séquençage du génome des deux partenaires, les recherches sur le pathosystème peuplier/*M. larici-populina* se sont accélérées et sont désormais entrées dans une ère dite post-génomique. Un effort de caractérisation des déterminants moléculaires de l'interaction chez les deux protagonistes est engagé au sein de l'UMR IAM. Mon travail de thèse s'est inscrit dans ce cadre et j'ai ainsi pu exploiter des données génomiques, effectuer des analyses transcriptomiques et développer et/ou utiliser des outils pour réaliser l'analyse fonctionnelle de protéines candidates (Figure 52). L'analyse *in silico* des TLP chez les eucaryotes a permis de dresser un bilan exhaustif des études fonctionnelles réalisées chez les plantes et de les mettre en relation avec la diversification de cette famille au cours de l'évolution. Chez le peuplier, l'annotation et la description experte de chaque membre de cette famille constituent un socle pour des analyses futures. L'étude du transcriptome des temps précoces de l'interaction peuplier/*M. larici-populina* montre clairement l'induction de l'expression d'un transporteur de sulfate par la colonisation du champignon. L'hypothèse d'un rôle dans la nutrition soufrée de parasites et de symbiontes biotrophes pour ce transporteur a été discutée, en prenant en compte les analyses récentes de génomes de parasites biotrophes obligatoires qui pointent la perte de gènes au sein des voies d'assimilation du

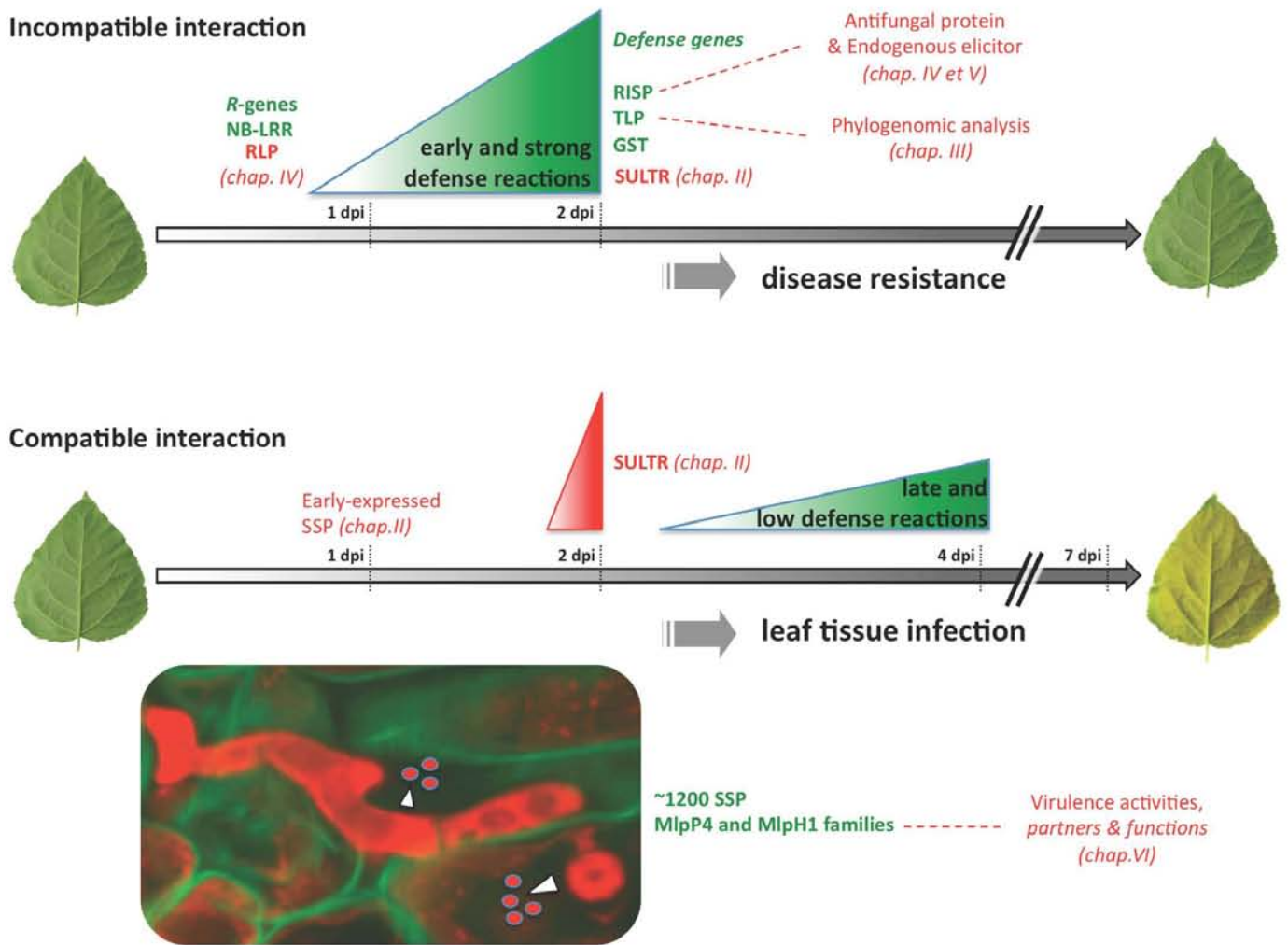


Figure 52. Schéma bilan des connaissances acquises sur le pathosystème peuplier/*M. larici-populina* au cours de cette thèse

Réprésentation schématique adaptée du modèle présenté dans la figure 42 du chapitre I de ce manuscrit (voir légende de la figure 42). Les principales contributions de mes travaux de thèse à ce modèle sont présentées en rouge.

Figure adaptée de Duplessis et al., *Critical Reviews in Plant Science*, 2009

soufre inorganique. Cette analyse transcriptomique a aussi permis de compléter les connaissances sur le pathosystème à des temps plus précoces au cours de l'interaction. D'autre part, l'analyse fonctionnelle de la protéine Risp, majoritairement basée sur la caractérisation de la protéine recombinante, a permis de démontrer une activité antifongique directe sur *M. larici-populina* mais également une activité d'éliciteur endogène des réponses de défense. La combinaison des deux activités au sein d'une même protéine est originale chez les plantes, et l'absence d'homologues chez d'autres espèces suggère une innovation propre au peuplier. L'analyse *in silico* des RLP et des gènes associés en cluster chez le peuplier suggère que l'activité d'éliciteur pourrait être médiée par l'interaction avec un RLP. Enfin, chez *M. larici-populina*, l'analyse de plusieurs centaines de gènes codant des SSP a conduit à la sélection des familles MlpP4 et MlpH1, au sein desquelles nous avons pu entamer la caractérisation ciblée d'effecteurs candidats. Certains membres de ces familles sont fortement induits durant l'infection des feuilles de peuplier et présentent des activités de virulence en système hétérologue, en agissant vraisemblablement au niveau du noyau et/ou du cytoplasme. Des cibles protéiques candidates des effecteurs candidats MlpP4.1 et MlpH1.1 ont été identifiées, incluant plusieurs protéases et oxydoréductases. La caractérisation biochimique et structurale des protéines recombinantes est bien avancée et devrait conduire à court terme à la caractérisation des premières structures tridimensionnelles de protéines pour l'agent de la rouille foliaire du peuplier. Mon travail de thèse a donc permis d'aborder sous de nombreux angles l'étude du pathosystème peuplier/*M. larici-populina*, me permettant d'acquérir des compétences techniques et scientifiques très diverses et il contribue à étendre nos connaissances sur l'interaction entre l'arbre et son parasite biotrophe.

7. Perspectives à court terme

A court terme, certaines expériences restées en suspens à l'issue de mon travail de thèse devront permettre de finaliser les articles non soumis qui sont présentés dans les chapitres IV, V et VI.

7.1 Valider l'induction des réponses de défense par Risp chez le peuplier

En plus des tests d'alcalinisation des cultures cellulaires, d'autres approches sont classiquement utilisées pour confirmer l'induction des réponses de défense (induction de l'expression des gènes de défense, accumulation des ROS, activation des MAPK, ... ;

Segonzac *et al.*, 2012). Ces approches ne sont pas encore utilisées en routine chez le peuplier. Nous avons infiltré la Risp recombinante dans des feuilles de peuplier et réalisé l'extraction des ARN pour suivre l'expression de certains gènes de défense. Les expériences de RT-qPCR sont en cours pour valider les profils d'expression du gène *Risp* d'une part mais aussi des gènes *PR-1* et *PR-5* qui sont induits lors de la mise en place de réactions de défense chez le peuplier. D'autre part, nous avons tenté de mettre en évidence la génération de ROS sur des disques foliaires excisés de peuplier en suivant un protocole validé chez *Arabidopsis*, sans succès jusqu'à présent (Schwessinger *et al.*, 2011). Néanmoins, des travaux conduits sur des feuilles entières du cultivar Beaupré infectées par *M. larici-populina* n'avaient pas montré de formation de ROS aux étapes précoces d'infection dans le cadre de l'interaction incompatible et les HR observées en fin de cycle d'infection étaient hyper-localisées (Laurans et Pilate, 1999 ; Rinaldi *et al.*, 2007). La formation de ROS dans le contexte de l'interaction avec *M. larici-populina* est limitée chez le peuplier, et le suivi de ROS n'est donc vraisemblablement pas le marqueur le plus adapté pour valider l'induction des réactions de défense. L'activation des MAPK a récemment été utilisée pour mettre en évidence des réponses de défense chez le peuplier, ce qui pourrait permettre dans notre cas de caractériser l'induction des mécanismes de défenses par Risp (Boyle *et al.*, 2010).

7.2 Démontrer de manière plus précise la sécrétion de Risp

L'expression transitoire de Risp avec son peptide signal en tabac a permis d'observer un signal de localisation au niveau des voies de sécrétion par microscopie à fluorescence. Afin d'évaluer de manière appropriée la sécrétion de Risp, il sera nécessaire de pratiquer des tests de plasmolyse suivis d'observations en microscopie confocale. La résolution de la structure tridimensionnelle de Risp liée aux spores de *M. larici-populina* sera engagée et pourrait permettre d'apporter une explication relative à l'activité antifongique de Risp. Selon la manière dont cette approche évolue, elle pourra être intégrée avant soumission dans l'article proposé dans ce manuscrit.

7.3 Structures et partenaires des effecteurs candidats

La résolution des structures 3D de MlpH1.1 et MlpP4.1 sera un élément clef de l'article en préparation (chapitre VI). La liste brute des partenaires potentiels sera étoffée par les partenaires manquants de MlpP4.1 chez *Arabidopsis*. La validation de ces partenaires pourra ensuite se faire par des méthodes complémentaires (double hybride en levure,

système divIVa, interactions directes entre protéines recombinantes, ...). Pour finir, certaines cibles des candidats d'intérêt étant des protéases, la capacité des protéines recombinantes à inhiber de manière spécifique ou non l'activité de protéases commerciales pourrait être testée rapidement.

8. Perspectives à long terme

L'ensemble des travaux que j'ai réalisés aura permis de développer des outils pour réaliser l'analyse fonctionnelle de fonctions clés du pathosystème. A moyen ou à plus long terme, il sera nécessaire d'optimiser certains des outils d'analyse que je mentionne dans la discussion générale de mes travaux, notamment la mise au point de méthodes de transformation transitoire sur peuplier. Cela permettra notamment d'engager de manière systématique l'analyse d'effecteurs candidats de *M. larici-populina* mais aussi de *L. bicolor*. Au sein de l'UMR IAM, les recherches sur le pathosystème peuplier/*M. larici-populina* s'effectuent dans le cadre d'un thème scientifique transversal qui vise à utiliser à la fois des approches de génomique et transcriptomique, de génomique des populations et de caractérisation fonctionnelle de protéines recombinantes pour identifier des fonctions clés dans le cadre du dialogue moléculaire établi entre l'agent pathogène et son hôte. Le séquençage des génomes de plusieurs souches de *M. larici-populina* a été réalisé récemment dans le cadre d'un projet de génomique des populations autour d'un évènement majeur de contournement d'une résistance qualitative à la rouille en peupleraie. Il est probable que cette approche mette à jour de nouveaux effecteurs candidats pertinents qui viendront compléter les listes déjà disponibles. L'analyse post-génomique du pathosystème peuplier/*M. larici-populina* en est encore à un stade précoce. Ma thèse a constitué à une étape charnière entre les approches descriptives et les approches fonctionnelles pour comprendre les bases moléculaires de l'interaction.

Les travaux conduits au sein de l'UMR IAM à Nancy sur la génomique et l'analyse moléculaire de l'interaction s'intègrent dans un cadre plus large de recherches conduites sur la durabilité des résistances à *M. larici-populina* chez le peuplier au sein d'un programme conjoint avec des collègues de l'UMR du centre INRA de Nancy (épidémiologie et génétique des populations du pathogène) et des centres INRA d'Orléans et d'Evry. Un résumé étendu présentant une vue globale des travaux conduits au sein du groupe de travail et réunissant l'ensemble des scientifiques concernés sera publié en 2012 par l'USDA Forest Service dans les actes du congrès *Disease and insect*

resistance in forest trees conference (Oregon, États-Unis, 2011). Cette très courte synthèse traite de la réflexion globale autour des résistances durables à la rouille sur le peuplier à l'INRA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alcazar R, Parker JE (2011) The impact of temperature on balancing immune responsiveness and growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 16, 666-675

Alcazar R, Reymond M, Schmitz G, De Meaux J (2011) Genetic and evolutionary perspectives on the interplay between plant immunity and development. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-7

Alfano JR (2009) Roadmap for the future research on plant pathogen effectors. *Molecular Plant Pathology*. 10, 805-813

Anand A, Lei Z, Sumner LW, Mysore KS, Arakane Y, Bockus WW, Muthukrishnan S (2004) Apoplastic Extracts from a Transgenic Wheat Line Exhibiting Lesion-Mimic Phenotype Have Multiple Pathogenesis-Related Proteins That Are Antifungal. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12, 1306-1317

Asai T, Tena G, Potnikova J, Willmann MR, Chuu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. 415, 977-983

Ayliffe M, Devilla R, Mago R, White R, Talbot M, Pryor A, Leung H (2011) Nonhost Resistance of Rice to Rust Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24, 1143-1155

Azaiez A, Boyle B, Levée V, Séguin A (2009) Transcriptome Profiling in Hybrid Poplar Following Interactions with *Melampora larici-populina*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22, 190-200

Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, Von Dahl CC, Preston CA (2006) Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: 'Talking Trees' in the Genomics Era. *Science*. 311, 812-815

Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J-P, Manieri W, Schürmann P, Droux M, Buchanan BB (2003) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 100, 370, 375

Baxter L, Tripathy S, Ishaque N, Boot N, Cabral A, Kemen E, Thines M -liste alphabétique de 38 auteurs - Clifton SW, Rogers J, Van Der Ackerveken G, Jones JDG, McDowell JM, Beynon J, Tyler BM (2010) Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science*. 330, 1549-1551

Beck M, Heard W, Mbengue M, Robatzek S (2012) The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Current Opinion in Plant Biology*. 15, 1-8

Bednarek P (2012) Chemical warfare or modulators of defence responses – the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 15, 1-8

- Bednarek P, Osbourn A** (2009) Plant-Microbe Interactions: Chemical Diversity in Plant Defense. *Science*. 324, 746-748
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A, Schulze-Lefert P** (2009) A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science*. 323, 101-106
- Bernoux M, Ve T, Williams S, Warren C, Hatters D, Valkov E, Zhang X, Ellis JG, Kobe B, Dodds PN** (2011a) Structural and Functional Analysis of a Plant Resistance Protein TIR Domain Reveals Interfaces for Self-Association, Signaling, and Autoregulation. *Cell Host & Microbe*. 9, 200-211
- Bernoux M, Ellis JG, Dodds PN** (2011b) New insights in plant immunity signaling activation. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-7
- Bharwaj V, Meier S, Petersen LN, Ingle RA, Roden LC** (2011) Defence Responses of *Arabidopsis thaliana* to Infection by *Pseudomonas syringae* Are Regulated by the Circadian Clock. *PLoS ONE*. 6, e26968
- Bhattacharjee S, Halane MK, Kim SH, Gassmann W** (2011) Pathogen Effectors Target *Arabidopsis* EDS1 and Alter Its Interactions with Immune Regulators. *Science*. 334, 1405-1408
- Block A, Alfano JR** (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Current Opinion in Microbiology*. 14, 39-46
- Boch J** (2011) TALEs of genome targeting. *Nature biotechnology*. 29, 135-136
- Boch J, Bonas U** (2010) Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors : Discovery and Function. *Annual Reviews in Phytopathology*. 48, 419-436
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas Ulla** (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*. 326, 1509-1512
- Boller T, He SY** (2009) Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*. 324, 742-744
- Boller T, Felix G** (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Reviews in Plant Biology*. 60, 379-406
- Bos JIB, Armstrong MR, Gilroy EM, Boevink PC, Hein I, Taylor RM, Zhendong T, Engelhardt S, Vetukiri RR, Harrower B, Dixelius C, Bryan G, Sadanandom A, Whisson SC, Kamoun S, Birch PRJ** (2010) *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 107, 9909-9914
- Bos JIB, Chaparro-Garcia A, Quesada-Ocampo LM, McSpadden Gardener BB, Kamoun S** (2009) Distinct Amino Acids of the *Phytophthora infestans* Effector AVR3a

Condition Activation of R3a Hypersensitivity and Suppression of Cell Death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22, 269-281

Both M, Csukai M, Stumpf MPH, Spanu PD (2005) Gene Expression Profiles of *Blumeria graminis* Indicate Dynamic Changes to Primary Metabolism during Development of an Obligate Biotrophic Pathogen. *The Plant Cell*. 17, 2107-2122

Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature*. 418, 889-892

Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature*. 464, 418-423

Boutemy LS, King SRF, Win J, Hugues RK, Clarke TA, Blumenscehein TMA, Kamoun S, Banfield MJ (2011) Structures of *Phytophthora* RXLR Effectors Proteins. A conserved but adaptable fold underpin functional diversity. *Journal of Biological Chemistry*. 286, 35834-35842

Boutrot F, Segonzac C, Chang KN, Qiao H, Ecker JR, Zipfel C, Rathjen JP (2010) Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factor EIN3 and EIL1. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 107, 14502-14507

Boyle B, Levée V, Hamel L-P, Nicole M-C, Séguin A (2010) Molecular and histochemical characterisation of two distinct poplar *Melampsora* leaf rust pathosystems. *Plant Biology*. 12, 364-376

Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current Opinion in Plant Biology*. 15, 1-10

Bozkurt TO, Schornack S, Win J, Shindo T, Ilyas M, Oliva R, Cano LM, Jones AME, Huitema E, Van Der Hoorn RAL, Kamoun S (2011) *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 20832-20837

Bresson A (2011) Caractérisation de R1 et RUS : deux loci de résistance à la rouille foliaire sur le chromosome 19 du peuplier. *Thèse de doctorat de L'Université d'Evry, France*.

Brown NA, Antoniw J, Hammond-Kosack KE (2012) The Predicted Secretome of the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*: A refined Comparative Analysis. *PLoS ONE*. 7, e33731

Brunner AM, Busov VB, Strauss SH (2004) Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science*. 9, 49-56

Brunner F, Nürnberger T (2012) Identification of immunogenic microbial patterns takes the fast lane. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 109, 4029-4030

Butenko MA, Vie AK, Brembu T, Aalen RB, Bones AM (2009) Plant peptides in signalling : looking for new partners. *Trends in Plant Science*. 14, 255-263

- Cantu D, Govindarajulu M, Kozik A, Wang M, Chen X, Kojima KK, Jurka J, Michelson RW, Dubcovsky J** (2011) Next Generation Sequencing Provides Rapid Access to the Genome of *Puccinia Striiformis* f. sp. *tritici*, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. *PLoS ONE*. 8, e24230
- Caillaud M-C, Piquerez SJM, Fabro G, Steinbrenner J, Ishaque N, Beynon J, Jones JDG** (2012) Subcellular localization of the *Hpa* RxLR effector repertoire identified a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *The Plant Journal*. 69, 252-265
- Cao J, Schneeberger K, Ossowski S, Günther T, Bender S, Fitz J, Koenig D, Lanz C, Stegle O, Lippert C, Wang X, Ott F, Müller J, Alonso-Blanco C, Borgwardt K, Schmid KJ, Weigel D** (2011) Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nature Genetics*. 49, 956-963
- Caplan A, Herrera-Estrella L, Inzé D, Van Haute E, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P** (1983) Introduction of genetic material into plant cells. *Science*. 222, 815-821
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Ve T, Kobe B, Ellis JG, Staskawicz BJ** (2010) The AvrM Effector from Flax Rust Has a Structurated C-Terminal Domain and Interacts Directly with the M Resistance Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 49-57
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG** (2006) Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *The Plant Cell*. 18, 243-256
- Chandran D, Inada N, Hather G, Kleindt C, Wildermuth MC** (2009) Laser microdissection of Arabidopsis cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 107, 460-465
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Gu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*. 468, 527-532
- Chibani K, Tarrago L, Gualberto JM, Wingsle G, Rey P, Jacquot J-P, Rouhier N** (2012) Atypical Thioredoxins in Poplar: The Glutathione-Dependent Thioredoxin-Like 2.1 Supports the Activity of Target Enzymes Possessing a Single Redox Active Cysteine. *Plant Physiology*. 159, 592-605
- Chibani K, Wingsle G, Jacquot J-P, Gelhaye E, Rouhier N** (2009) Comparative Genomic Study of the Thioredoxin Family in Photosynthetic Organismes with Emphasis on *Populus trichocarpa*. *Molecular Plant*. 2, 308-322
- Chinchilla D, Boller T** (2012) Innate immunity: Pattern Recognition in Plants. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.
- Chou S, Krasileva KV, Holton JM, Steinbrenner AD, Alber T, Staskawicz BJ** (2011) *Hyaloperonospora arabidopsidis* ATR1 effector is a repeat protein with distributed

recognition surfaces. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 13323-13331

Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibaragi K, Futamata N, Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki H, Valent B, Tosa Y (2011) Multiple Translocation of the AVR-Pita Effector Gene among Chromosomes of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* and Related Species. *PLoS Pathogens*. 7, e1002147

Ciuffetti LM, Manning VA, Pandelova I, Betts MF, Martinez JP (2010) Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *New Phytologist*. 187, 911-919

Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM (2009) Glucosinolate Metabolites Required for an *Arabidopsis* Innate Immune Response. *Science*. 323, 95-101

Coates ME, Beynon JL (2010) *Hyaloperonospora arabidopsidis* as a Pathogen Model. *Annual Reviews in Phytopathology*. 48, 329-345

Collier SM, Moffett P (2009) NB-LRRs work a 'bait and switch' on pathogens. *Trends in Plant Science*. 14, 521-529

Cornelis GR (2006) The Type III secretion injectisome. *Nature Reviews in Microbiology*. 4, 811-825

Couch BC, Kohn LM (2002) A multilocus gene genealogy concordant with host preferences indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*. 94, 683-693

Couturier J, Ströher E, Albetel A-N, Roret T, Muthuramalingam M, Tarrago L, Seidel T, Tsan P, Jacquot J-P, Johnson MK, Dietz K-J, Diderjean C, Rouhier N (2011) *Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins. *Journal of Biological Chemistry*. 286, 27515-27527

Couturier J, Jacquot J-P, Rouhier N (2009) Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66, 2539-2557

Cunnac S, Chakravarthy S, Kvitko BH, Russell AB, Martin GB, Collmer A (2011) Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 2975-2980

D'Amato A, Kravchuk AV, Bachi A, Righetti PG (2010) Noah's nectar: The proteome content of a glass of red wine. *Journal of Proteomics*. 73, 2370-2377

Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411, 826-833

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13, 414-430

- De Jonge R, Van Esse HP, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV, Thomma BPHJ** (2012) Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 109, 5110-5115
- De Jonge R, Van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, Van Der Krol S, Shibuya N, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ** (2009) Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Trigged Immunity in Plants. *Science.* 329, 953-955
- De Jonge R, Thomma BPHJ** (2009) Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology.* 17, 151-157
- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu J-K, Shi Y, Yan N** (2012) Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science.* 335, 720-723
- Deslandes L, Rivas S** (2012) Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science.* doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.011
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 411, 843-847
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, Feussner K, Meinicke P, Stierhof Y-D, Schwarz H, Macek B, Mann M, Kahmann R** (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature.* 478, 395-398
- Dodds PN** (2010) Genome Evolution in Plant Pathogens. *Science.* 330, 1486-1487
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews in Genetics.* 11, 539-548
- Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG** (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist.* 183, 993-1000
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Teh T, Wang C-IA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG** (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 103, 8888-8893
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Ayliffe MA, Ellis JG** (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 Avirulence Genes Are Expressed in Haustoria and Their Products are Recognized Inside Plant Cells. *The Plant Cell.* 16, 755-768
- Doehlemann G, Schipper K, Kahmann R** (2012) The Effectors of Smut Fungi. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.
- Doehlemann G, Reissmann S, Assmann D, Fleckenstein M, Kahmann R** (2011) Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular Microbiology.* 81, 751-766
- Doehlemann G, Van Der Linde K, Assmann D, Schwambach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D, Kahmann R** (2009) Pep1, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *PLoS Pathogens.* 5, e1000290

- Dong S, Yin W, Kong G, Yang X, Qutob D, Chen Q, Kale SD, Sui Y, Zhang Z, Dou D, Zheng X, Gijzen M, Tyler BM, Wang Y** (2011) *Phytophthora sojae* Avirulence Effector Avr3b is a Secreted NADH and ADP-ribose Pyrophosphorylase that Modulates Plant Immunity. *PLoS Pathogens*. 7, e1002353
- Dou D, Kale SD, Wang X, Jiang RHY, Bruce NA, Arredondo FD, Zhang X, Tyler BM** (2008) RXLR-Mediated Entry of *Phytophthora sojae* Effector Avr1b into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. *The Plant Cell*. 20, 1930-1947
- Duplessis S, Joly DL, Dodds PN** (2012) Rust Effectors. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.
- Duplessis S, Cuomo CA, Lin Y-C, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DJ, Hacquard S – liste alphabétique de 31 auteurs – Henrissat B, Van de Peer Y, Rouzé P, Ellis JG, Dodds PN, Schein JE, Zhong S, Hamelin RC, Grigoriev IV, Szabo LJ, Martin F** (2011a) Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 9166-9171
- Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P, Martin F, Kohler A** (2011b) *Melampsora larici-populina* Transcript Profiling During Germination and Timecourse Infection of Poplar Leaves Reveals Dynamic Expression Patterns Associated with Virulence and Biotrophy. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24, 808-818
- Duplessis S, Major I, Martin F, Séguin A** (2009) Poplar and Pathogen Interactions: Insights from *Populus* Genome-Wide Analyses of Resistance and Defense Gene Families and Gene Expression Profiling. *Critical Reviews in Plant Science*. 28, 309-334
- Eckenwalder JE** (1996) In *Biology of Populus and its implication for management and conservation*, eds Bradshaw RFJr, Heilman PE, Hinckley TM, Steller, NRC research press, pp7-32
- El-kereamy A, El-sharkawy I, Ramamoorthy R, Taheri A, Errampalli D, Kumar P, Jayasankar S** (2011) *Prunus domestica* Pathogenesis-Related Protein-5 Activates the Defense Response Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection. *PLoS ONE*. 3, e17973
- Ellis JG, Dodds PN** (2011) Showdown at the RXLR motif: Serious differences of opinion in how effector proteins from filamentous eukaryotic pathogens enter plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 14381-14382
- Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ** (2007) Flax Rust Resistance Gene Specificity is Based on Direct Resistance-Avirulence Protein Interactions. *Annual Reviews in Phytopathology*. 45, 12.1-12.18
- Eulgem T** (2004) Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science*. 10, 71-78
- Fabro G, Steinbrenner J, Coates M, Ishaque N, Baxter L, Studholme DJ, Körner E, Allen RL, Piquerez SJM, Rougon-Cardoso A, Greenshields D, Lei R, Badel JL, Caillaud M-C, Sohn K-H, Van Den Ackerveken G, Parker JE, Beynon J, Jones JDG** (2011) Multiple Candidate Effectors from the Oomycete Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* Suppress Host Plant Immunity. *PLoS Pathogens*. 7, e1002348

- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V** (2009) The Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* Stimulates Lateral Root Formation in Poplar and Arabidopsis through Auxin Transport and Signaling. *Plant Physiology*. 151, 1991-2005
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou J-M** (2012) A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature*. 485, 114-118
- Fernandez D, Tisserant E, Talhinhos P, Azinheira H, Vieira A, Petitot A-S, Loureiro A, Poulain J, Da Silva C, Do Céu Silva M, Duplessis S** (2012) 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Molecular Plant Pathology*. 13, 17-37
- Flor HH** (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*. 32, 653-659
- Flor HH** (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annual Reviews in Phytopathology*. 9, 275-296
- Franco OL** (2011) Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. *FEBS Letters*. 585, 995-1000
- Frei dit Frey N, Robatzek S** (2009) Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 437-443
- Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, Rasmussen JB, Solomon PS, McDonald BA, Oliver RP** (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*. 38, 953-956
- Fritz-Laylin LK, Krishnamurthy N, Tör M, Sjölander KV, Jones JDG** (2005) Phylogenomic Analysis of the Receptor-Like Proteins of Rice and Arabidopsis. *Plant Physiology*. 138, 611-623
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X** (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*. 486, 228-232
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*. 9, 436-442
- Gan PHP, Rafiqi M, Ellis JG, Jones DA, Hardham AR, Dodds PN** (2010) Lipid binding activities of flax rust AvrM and AvrL567 effectors. *Plant Signaling and Behavior*. 5, 1-4
- Gan X, Stegle O, Behr J, Steffen JG, Drewe P, Hildebrand KL, Lyngsoe R, Schultheiss SJ, Osborne EJ, Sreedharan VT, Kahles A, Bohnert R, Jean G, Derwent P, Kersey P, Belfield EJ, Hardberd NP, Kemen E, Toomajian C, Kover PX, Clark RM, Ratsch G, Mott R** (2011) Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 477, 419-423

- Gaupels F, Kuruthukulangarakoola GT, Durner J** (2011) Upstream and downstream of nitric oxide in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-8
- Gheysen G, Mitchum MG** (2011) How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-7
- Gilbert GS, Webb CO** (2007) Phylogenetic signal in plant pathogen-host range. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 104, 4979-4983
- Godfrey D, Böhlenius H, Pedersen C, Zhang Z, Emmersen J, Thordal-Christensen H** (2010) Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics*. 11, 317
- Goellner K, Loehrer M, Langenbach C, Conrath U, Koch E, Schaffrath U** (2010) *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*. 11, 169-177
- Gomez-Gomez L, Boller T** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*. 5, 1003-1011
- Grant MR, Jones JDG** (2009) Hormone (Dis)harmony Moulds Plant Health and Disease. *Science*. 324, 750-752
- Guo M, Tian F, Wamboldt Y, Alfano JR** (2009) The Majority of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Can Suppress Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22, 1069-1080
- Guo Y, Ni J, Denver R, Wang X, Clark SE** (2011) Mechanisms of Molecular Mimicry of Plant CLE Peptide Ligands by the Parasitic Nematode *Globodera rostochiensis*. *Plant Physiology*. 157, 476-484
- Guo Z, Bonos S, Meyer WA, Day PR, Belanger FC** (2003) Transgenic creeping bentgrass with delayed dollar spot symptoms. *Molecular Breeding*. 11, 95-101
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO - liste alphabétique de 78 auteurs - Fry W, Meyers BC, Van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PRJ, Whisson SC, Judelson HS, Nusbaum C** (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*. 461, 393-398
- Hacquard S, Joly DL, Lin Y-C, Tisserant E, Feau N, Delaruelle C, Legué V, Kohler A, Tanguay P, Petre B, Frey P, Van de Peer Y, Rouzé P, Martin F, Hamelin RC, Duplessis S** (2012) A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identifies Candidate Effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25, 279-293
- Hacquard S, Petre B, Frey P, Hecker A, Rouhier N, Duplessis S** (2011) The Poplar-Poplar Rust Interactions: Insights from Genomics and Transcriptomics. *Journal of Pathogens*. doi:10.4061/2011/716041
- Hacquard S, Delaruelle C, Legué V, Tisserant E, Kohler A, Frey P, Martin F, Duplessis S** (2010a) Laser Capture Microdissection of Uredinia Formed by *Melampsora*

larici-populina Revealed a Transcriptional Switch Between Biotrophy and Sporulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 1275-1286

Hacquard S, Veneault-Fourrey C, Delaruelle C, Frey P, Martin F, Duplessis S (2010b) Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for *in planta* RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 75, 106-112

Hacquard S (2010c) Contribution à l'étude des déterminants génétiques impliqués dans le processus infectieux de *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille foliaire du peuplier. *Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, France*.

Hahn M, Mendgen K (1997) Characterization of *In Planta*-Induced Rust Genes Isolated from a Haustorium-Specific cDNA Library. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10, 427-437

Hammami R, Ben Hamida J, Vergoten G, Fliss I (2008) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*. 37, 963-968

Hancock REW, Sahl H-G (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutics strategies. *Nature Biotechnology*. 24, 1551-1557

Haney EF, Hunter HN, Matsuzaki K, Vogel HJ (2009) Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? *Biochimica & Biophysica Acta*. 1788, 1639-1655

Hann D, Boller T (2012) Microbial Effectors and Their Role in Plant Defense Suppression. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.

Heidrich K, Wirthmueller L, Tasset C, Pouzet C, Deslandes L, Parker JE (2011) *Arabidopsis* EDS1 Connects Pathogen Effector Recognition to Cell Compartment-Specific Immune Responses. *Science*. 334, 1401-1404

Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G (2012) The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppress Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. *PLoS Pathogens*. 8, e1002684

Herman M (2012) Fighting for their lives: Plants and pathogens. *Teaching Tool in plant Biology – The Plant Cell*. Cours en ligne.

Hogenhout SA, Bos JIB (2011) Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-7

Hogenhout SA, Van Der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22, 115-122

Hok S, Attard A, Keller H (2010) Getting the Most from the Host: How Pathogens Force Plants to Cooperate in Disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 1253-1259

- Horvath DM, Stall RE, Bones JB, Pauly MH, Vallad GE, Dahlbeck D, Staskawicz BJ, Scott JW** (2012) Transgenic Resistance Confers Effective Field Level Control of Bacterial Spot Disease in Tomato. *PLoS ONE*. 7, e42036
- Houterman PM, Cornelissen BKC, Rep M** (2008) Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. *PLoS Pathogens*. 4, e1000061
- Huang K, Czymmek KJ, Caplan JL, Sweigard JA, Donofrio NM** (2011) HYR1-Mediated Detoxication of Reactive Oxygen Species Is Required for Full Virulence in the Rice Blast Fungus. *PLoS Pathogens*. 7, e1001335
- Hummel AW, Doyle EL, Bogdanove AJ** (2012) Addition of transcription activator-like effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak. *New Phytologist*. 195, 883-893
- Humphry M, Bednarek P, Kemmerling B, Koh S, Stein M, Göbel U, Stüber K, Pislewska-Bednarek M, Loraine A, Schulze-Lefert P, Somerville S, Panstruga R** (2010) A regulon conserved in monocots and dicots plants defines a functional module in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 107, 21896-21901
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*. 19, 4004-4014
- Jiang RHY, Tyler BM** (2012) Mechanisms and Evolution of Virulence in Oomycetes. *Annual Reviews in Phytopathology*. 50, 295-318
- Joly DL, Feau N, Tanguay P, Hamelin RC** (2010) Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.). *BMC Genomics*. 11, 422
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature*. 444, 323-329
- Kale SD** (2012) Oomycete and fungal effector entry, a microbial Trojan horse. *New Phytologist*. 193, 874-881
- Kale SD, Tyler BM** (2011) Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. *Cellular Microbiology*. 13, 1839-1848
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, Dou D, Feldman E, Rumore A, Arredondo FD, Hanlon R, Fudal I, Rouxel T, Lawrence CB, Shan W, Tyler BM** (2010) External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell*. 142, 284-295
- Kamoun S** (2007) Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology*. 10, 358-365
- Kämper J, Kahmann R, Michael Bölker, Ma L-J - liste de 74 auteurs - Galagan J, Birren BW** (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. 444, 97-101

- Kankanala P, Czymmek K, Valent B** (2007) Roles for Rice Membrane Dynamics and Plasmodesmata during Biotrophic Invasion by the Blast Fungus. *The Plant Cell*. 19, 706-724
- Kaschani F, Shabab M, Bozkurt T, Shindo T, Schornack S, Gu C, Ilyas M, Win J, Kamoun S, Van Der Hoorn RAL** (2010) An Effector-Targeted Protease Contributes to Defense against *Phytophthora infestans* and Is under Diversifying Selection in Natural Hosts. *Plant Physiology*. 154, 1794-1804
- Katagiri F, Tsuda K** (2010) Understanding the Plant Immune System. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 1531-1536
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U** (2007) A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science*. 318, 648-651
- Kearney B, Staskawicz BJ** (1990) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene avrBs2. *Nature*. 346:385-386
- Kemen E, Jones JDG** (2012) Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles? *Trends in Plant Science*. 17, 448-457
- Kemen E, Gardinier A, Schultz-Larsen T, Kemen AC, Balmuth AL, Robert-Selaniantz, Bailey K, Holub E, Studholme DJ, MacLean D, Jones JDG** (2011) Gene Gain and Loss during Evolution of Obligate Parasitism in the White Rust Pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*. 9, e1001094
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT** (2005) Identification of a Protein from Rust Fungi Transferred from Haustoria into Infected Plant Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18, 1130-1139
- Kemmerling B, Halter T, Mazzotta S, Mosher S, Nürnberger T** (2011) A genome-wide survey for *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinases implicated in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*. 2, 1-6
- Khang CH, Berruyer R, Giraldo MC, Kankanala P, Park S-Y, Czymmek K, Kang S, Valent B** (2010) Translocation of *Magnaporthe oryzae* Effectors into Rice Cells and Their Subsequent Cell-to-Cell Movement. *The Plant Cell*. 22, 1388-1403
- Kim YS, Park JY, Kim KS, Ko MK, Cheong SJ, Oh B-J** (2002) A thaumatin-like gene in nonclimateric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Molecular Biology*. 49, 125-135
- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Ver Loren Van Themaat E, Van Der Does HC, Hacquard S, Stüber K, Will I, Schmalenbach W, Schmelzer E, O'Connell RJ** (2012) Sequential Delivery of Host-Induced Virulence Effectors by Appressoria and Intracellular Hyphae of the Phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens*. 8, e1002643
- Kliebenstein DJ, Rowe HC** (2008) Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Science*. 174, 551-556

- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N** (2011) A Secreted Fungal Effector of *Glomus intraradices* Promotes Symbiotic Biotrophy. *Current Biology*. 21, 1-6
- Koeck M, Hardham AR, Dodds PN** (2011) The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular Microbiology*. 13, 1849-1857
- Kohler A, Rinaldi C, Duplessis S, Baucher M, Geelen D, Duchaussoy F, Meyers BC, Boerjan W, Martin F** (2008) Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology*. 66, 619-636
- Kruger J, Thomas CM, Golstein C, Dixon MS, Smoker M, Tang S, Mulder L, Jones JDG** (2002) A Tomato Cystein Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance and Suppression of Autonecrosis. *Science*. 296, 744-747
- Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Krämer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Suganuma N, Udvardi MK** (2005) The Sulfate Transporter SST1 Is Crucial for Symbiotic Nitrogen Fixation in *Lotus japonicus* Root Nodules. *The Plant Cell*. 17, 1625-1636
- Kunkeaw S, Tan S, Coaker G** (2010) Molecular and Evolutionary Analyses of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Race 1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 415-424
- Kvitko BH, Park DH, Velasquez AC, Wei C-F, Russell AB, Martin GB, Schneider DJ, Collmer A** (2009) Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors. *PLoS Pathogens*. 5, e1000388
- Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, Peter Van Hesse H, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz B, Jones JDG, Zipfel C** (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology*. 28, 365-370
- Laurie JD, Ali S, Linning R, Mannhaupt G, Wong P, Güldener U, Münsterkötter M, Moore R, Kahmann R, Bakkeren G, Schirawski J** (2012) Genome Comparison of Barley and Maize Smut Fungi Reveals Targeted Loss of RNA Silencing Components and Species-Specific Presence of Transposable Elements. *The Plant Cell*. 24, 1733-1745
- Lawrence GJ, Dodds PN, Ellis JG** (2009) Transformation of the flax rust fungus, *Melampsora lini*: selection via silencing of an avirulence gene. *The Plant Journal*. 61, 364-369
- Le Bourse D, Conreux A, Villaume S, Lameiras P, Nuzillard J-M, Jeandet P** (2011) Quantification of chitinases and thaumatin-like proteins in grape juices and wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 401, 1541, 1549
- Lee J-Y, Lu H** (2011) Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in Plant Science*. 16, 201-210
- Lee SC, Hwang IS, Hwang BK** (2011) Overexpression of the pepper antimicrobial protein CaAMP1 gene regulates the oxidative stress- and disease-related proteome in *Arabidopsis*. *Planta*. 234, 1111-1125

- Lee SC, Hwang IS, Choi HW, Hwang BK** (2008) Involvement of the Pepper Antimicrobial Protein CaAMP1 Gene in Broad Spectrum Disease Resistance. *Plant Physiology*. 148, 1004-1020
- Lehti-Shiu M, Zou C, Hanada K, Shiu S-H** (2009) Evolutionary History and Stress Regulation of Plant Receptor-Like Kinase/Pelle Genes. *Plant Physiology*. 150, 12-26
- Leonelli L, Pelton J, Schoffler A, Dahlbeck D, Berger J, Wemmer DE, Staskawicz B** (2011) Structural Elucidation and Functional Characterization of the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Effector Protein ATR13. *PLoS Pathogens*. 12, e1002428
- Levéé V, Major I, Levasseur C, Tremblay L, MacKay J, Séguin A** (2009) Expression profiling and functional analysis of *Populus* WRKY23 reveals a regulatory role in defense. *New Phytologist*. 184, 48-70
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B** (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produced disease-resistance rice. *Nature Biotechnology*. 30, 390-391
- Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A** (2012) *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in Microbiology*. 20, 199-208
- Lipka U, Fuchs R, Lipka V** (2008) Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 404-411
- Liu J-J, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM** (2010a) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports*. 29, 419-436
- Liu J-J, Zamani A, Ekramoddoullah AKM** (2010b) Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine. *Planta*. 231, 637-651
- Liu T, Liu Z, Song C, Hu Y, Han Z, She Ji, Fan F, Wang J, Jin C, Chang J, Zhou J-M, Chai J** (2012) Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science*. 336, 1160-1164
- Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L** (2011) Direct Ubiquitination of Pattern Recognition Receptor FLS2 Attenuates Plant Innate Immunity. *Science*. 332, 1439-1442
- 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
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J** (2012) Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*. 158, 844-853
- Lysoe E, Seong K-Y, Kistler HC** (2011) The Transcriptome of *Fusarium graminearum* During the Infection of Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24, 995-1000
- Ma L-J, Van Der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi M-J, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, Houterman PM, Kang S, Shim W-B, Woloshuk C, Xie X, Xu J-R - liste alphabétique de 43 auteurs - Galagan J, Cuomo CA, Kistler HC, Rep M** (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*. 464, 367-373

- Ma W, Guttman DS** (2008) Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 412-419
- Maekawa T, Cheng W, Spiridon LN, Töller A, Lukasik E, Saijo Y, Liu P, Shen Q-H, Micluta MA, Somssich IE, Takken FLW, Petrescu A-J, Chai J, Schulze-Lefert P** (2011) Coiled-Coil Domain-Dependent Homodimerization of Intracellular Barley Immune Receptors Defines a Minimal Functional Module for Triggering Cell Death. *Cell Host & Microbe*. 9, 187-199
- Mak AN-S, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL** (2012) The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA target. *Science*. 335, 716-719
- Manning VA, Hamilton SM, Karplus PA, Ciuffetti LM** (2008) The Arg-Gly-Asp-Containing, Solvent-Exposed Loop of Ptr ToxA Is Required for Internalization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21, 315-325
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD** (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 12, 614-629
- Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, Lopez-García B** (2008) Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annual Reviews in Plant Biology*. 46, 273-301
- Martin F, Kamoun S** (2012) Effectors in Plant–Microbe Interactions. eds. *F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition*.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A – liste alphabétique de 33 auteurs – Henrissat B, Lebrun M-H, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P** (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*. 464, 1033-1038
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J – list alphabétique de 41 auteurs – Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van De Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV** (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 452, 88-92
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD** (1993) Map-based cloning of a protein kinase conferring disease resistance in tomato. *Science*. 262, 1432-1436
- Massoud K, Barchietto T, Le Rudulier T, Pallandre L, Didierlaurent L, Garmier M, Ambard-Bretteville F, Seng J-M, Saindrenan P** (2012) Dissecting Phosphite-Induced Priming in Arabidopsis Infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiology*. 159, 286-298

- McCann HC, Nahal H, Thakur S, Guttman DS** (2012) Identification of innate immunity elicitors using molecular signatures of natural selection. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 109, 4215-4220
- Melotto M, Underwood W, He SY** (2008) Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Reviews in Plant Biology.* 46, 101-122
- Mendgen K, Hahn M** (2002) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science.* 7, 352-356
- Mentlak TA, Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BPHJ, Talbot NJ** (2012) Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by *Magnaporthe oryzae* Is Necessary for Rice Blast Disease. *The Plant Cell.* 24, 322-335
- Menu-Bouaouiche L, Vriet C, Peumans WJ, Barre A, Van Damme EJM, Rougé P** (2003) A molecular basis for the endo- β 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie.* 85, 123-131
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW** (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 15, 809-834
- Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, Bohlmann J, Constabel CP** (2007) The Transcriptional Response of Hybrid Poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to Infection by *Melampsora medusae* Leaf Rust Involves Induction of Flavonoid Pathway Genes Leading to the Accumulation of Proanthocyanidins. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 20, 816-831
- Molinier J, Ries G, Zipfel C, Hohn B** (2006) Transgeneration memory of stress in plants. *Nature.* 442, 1046-1049
- Monaghan J, Zipfel C** (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology.* 15, 1-9.
- Moore JW, Loake GJ, Spoel SH** (2011) Transcription Dynamics in Plant Immunity. *The Plant Cell.* 23, 2809-2820
- Morrissey JP, Osbourn AE** (1999) Fungal Resistance to plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63, 708-724
- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003) Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell.* 113, 935-944
- Moscou MJ, Bogdanove AJ** (2009) A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science.* 326, 1501
- Mueller O, Kahmann R, Aguilar G, Trejo-Aguilar B, Wu A, de Vries RP** (2008) The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology.* 45, 563-570
- Mukthar MS, Carvunis A-R, Dreze M, Epple P, Steinbrenner J, Moore J, Tasan M, Galli M, Hao T, Nishimura MT - liste de 20 auteurs, plus le European Union Effectoromics Consortium, Vidal M, Beynon J, Braun P, Dangl JL** (2011)

Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. *Science*. 333, 596-601

Naumann TA, Price NPJ (2012) Truncation of class IV chitinases from Arabidopsis by secreted fungal proteases. *Molecular Plant Pathology*. DOI:10.1111/J.1364-3703.2012.00805.X

Nekrasov V, Li J, Batoux M, Roux M, Chu Z-H, Lacombe S, Rougon A, Bittel P, Kiss-Papp M, Chinchilla D, van Esse HP, Jorda L, Schwessinger B, Nicaise V, Thomma BPHJ, Molina A, Jones JDG, Zipfel C (2009) Control of the pattern-recognition receptor EFR by an ER protein complex in plant immunity. *The EMBO Journal*. 28, 3428-3438

Nirmala J, Drader T, Lawrence PK, Yin C, Hulbert S, Steber CM, Steffenson BJ, Szabo LJ, von Wettstein D, Kleinhofs A (2011) Concerted action of two avirulent spore effectors activates *Reaction to Puccinia graminis 1 (Rpg1)*-mediated cereal stem rust resistance. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 14676-15681

Nirmala J, Drader T, Chen X, Steffenson B, Kleinhofs A (2010) Stem Rust Spores Elicit Rapid RPG1 Phosphorylation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 1635-1642

Nishimura MT, Dangl JL (2010) Arabidopsis and the plant immune system. *The Plant Journal*. 61, 1053-1066

Nühse TS, Bottrill AR, Jones AME, Peck SC (2007) Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *The Plant Journal*. 51, 931-940

O'Brien HE, Thakur S, Guttman DS (2011) Evolution of Plant Pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A Genomics Perspective. *Annual Reviews in Plant Biology*. 49, 269-289

O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Aymotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L – liste alphabétique de 52 auteurs – Dickman MB, Schulze-Lefert P, Ver Loren van Themaat E, Ma L-J, Vaillancourt LJ (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*. 12, 1060-1065

Oh C-S, Martin GB (2011) Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends in Plant Science*. 16, 132-140

Oh S-K, Young C, Lee M, Oliva R, Bozkurt TO, Cano LM, Win J, Bos JIB, Liu H-Y, Van Damme M, Morgan W, Choi D, Van Der Vossen EAG, Vleeshouwers VGAA, Kamoun S (2009) *In Planta* Expression Screens of *Phytophthora infestans* RXLR Effectors Reveal Diverse Phenotypes, Including Activation of the *Solanum bulbocastanum* Disease Resistance Protein Rpi-blb2. *The Plant Cell*. 21, 2928-2947

Palacin A, Tordesillas L, Gamboa P, Sanchez-Monge R, Cueast-Herranz J, Sanz ML, Barber D, Salcedo G, Diaz-Perales A (2010) Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clinical & Experimental Allergy*. 40, 1422-1430

Panstruga R, Dodds PN (2009) Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. *Science*. 324, 748-750

- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA** (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. 253, 895-897
- Pelegrini PB, del Sarto RP, Silva ON, Franco OL, Grossi-de-Sa MF** (2011) Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. *Biochemistry Research International*. doi:10.1155/2011/250349
- Peschel A, Sahl H-G** (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews in Microbiology*. 4, 529-536
- Petre B, Morin E, Tisserant E, Hacquard S, Da Silva C, Poulain J, Delaruelle C, Martin F, Rouhier N, Kohler A, Duplessis S** (2012) RNA-Seq of Early-Infected Poplar Leaves by the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Uncovers PtSultr3;5, a Fungal-Induced Host Sulfate Transporter. *PLoS ONE*. 7, e44408
- Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S** (2011a) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biology*. 11, 33
- Petre B, Major I, Frey P, Martin F, Rouhier N, Duplessis S** (2011b) Les apports de la génomique pour l'étude des familles multigéniques : exemple des thaumatin-like proteins (TLPs) chez le peuplier. *Acte du séminaire de l'école doctorale RP2E*. ISBN 2-9518564-9-0
- Pieterse CMJ** (2012) Prime Time for Transgenerational Defense. *Plant Physiology*. 158, 545
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees CMV** (2012) Hormonal modulation of Plant Immunity. *Annual Reviews in Plant Biology*. 28, 28.1-28.33
- Pinon J, Frey P** (2005) Interactions between Poplar Clones and *Melampsora* Populations and their Implications for Breeding for Durable Resistance. In: *Rust Diseases of Willow and Poplar*. eds Pei MH, McCracken AR. CAB International.
- Pitman AR, Jackson RW, Mansfield JW, Kaltell V, Thwaites R, Arnold DL** (2005) Exposure to Host Resistance Mechanisms Drives Evolution of Bacterial Virulence in Plants. *Current Biology*. 15, 2230-2235
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H** (2009) MAPK cascade signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 421-426
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F** (2011) A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Current Biology*. 21, 197-1203
- Pretsch K, Kemen A, Kemen E, Geiger M, Mendgen K, Voegelé R** (2012) The rust-transferred proteins-a new family of effectors proteins exhibiting protease inhibitor function. *Molecular Plant Pathology*. DOI:10.1111/J.1364-3703.2012.00832.X
- Proost S, Pattyn P, Gerats T, Van De Peer Y** (2011) Journey through the past: 150 millions years of plant genome evolution. *The Plant Journal*. 66, 58-65

- Qutob D, Tedman-Jones J, Dong S, Kuflu K, Pham K, Wang Y, Dou D, Kale SD, Arredondo FD, Tyler BM, Gijzen M** (2009) Copy Number Variation and Transcriptional Polymorphisms of *Phytophthora sojae* RXLR Effector Genes *Avr1a* and *Avr3a*. *PLoS ONE*. 4, e5066
- Raffaele S, Kamoun S** (2012) Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews in Microbiology*. 10, 417-430
- Raffaele S, Farrer RA, Cano LM, Studholme DJ, MacLean D, Thines M, Jiang RHY, Zody MC, Kunjeti SG, Donofrio NM, Meyers B, Nusbaum C, Kamoun S** (2010) Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Science*. 330, 1540-1543
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Hardham AR, Dodds PN** (2012) Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 15, 1-6
- Rafiqi M, Gan PHP, Ravensdale M, Lawrence GJ, Ellis JG, Jones DA, Hardham AR, Dodds PN** (2010) Internalization of Flax Rust Avirulence Proteins into Flax and Tobacco Cells Can Occur in the Absence of the Pathogen. *The Plant Cell*. 22, 2017-2032
- Ravensdale M, Nemri A, Thrall PH, Ellis JG, Dodds PN** (2011) Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. *Molecular Plant Pathology*. 12, 93-102
- Rentel MC, Leonelli L, Dahlbeck D, Zhao B, Staskawicz BJ** (2008) Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 105, 1091-1096
- Richards TA, Soanes DM, Jones MDM, Vasieva O, Leonard G, Paszkiewicz K, Foster PG, Hall N, Talbot N** (2011) Horizontal gene transfer facilitated the evolution of plant parasitic mechanisms in the oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 15258-15263
- Rigal A** (2011) Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des racines adventives du Peuplier : rôle du facteurs de transcription PtAIL1. *Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine*.
- Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JDG, Brown JKM** (2006) Multiple Avirulence Paralogues in Cereal Powdery Mildew Fungi May Contribute to Parasite Fitness and Defeat of Plant Resistance. *The Plant Cell*. 18, 2402-2414
- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F, Duplessis S** (2007) Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology*. 144, 347-366
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T** (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes and Development*. 20, 537-542

- Römer P, Recht S, Lahaye T** (2009) A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 106, 20526-20531
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T** (2007) Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper *Bs3* Resistance Gene. *Science*. 318, 645-648
- Rose LE, Bittner-Eddy PD, Langley CH, Holub EB, Michelmore RW, Beynon JL** (2004) The Maintenance of Extreme Amino Acid Diversity at the Disease Resistance Gene, *RPP13*, in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 166, 1517-1527
- Rouhier N, Villarejo A, Srivastava M, Gelhaye E, Keech O, Droux M, Finkemeier I, Samuelsson G, Dietz K-J, Jacquot J-P, Wingsle G** (2005) Identification of Plant Glutaredoxin Targets. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7, 919-929
- Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, Van de Wouw AP, Couloux A, Dominguez V – liste alphabétique de 28 auteurs – Amselem J, Quesneville H, Oliver RP, Wincker P, Balesdent M-H, Howlett BJ** (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications*. 2, 202
- Rubin EM** (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 454, 841-845
- Ryan CA, Pearce G** (2003) Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in *Solanaceae* species. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 100, 14577-14580
- Saijo Y, Schulze-Lefert P** (2008) Manipulation of the Eukaryotic Transcriptional Machinery by Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe*. 4, 96-99
- Saitoh H, Fujisawa S, Mitsuoka C, Ito A, Hirabuchi A, Ikeda K, Irieda H, Yoshino K, Yoshida K, Matsumura H, Tosa Y, Win J, Kamoun S, Takano Y, Terauchi R** (2012) Large-Scale Gene Disruption in *Magnaporthe oryzae* Identified MC69, a Secreted Protein Required for Infection by Monocot and Dicot Fungal Pathogens. *PLoS Pathogens*. 8, e1002711
- Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA** (1998) Coordinate Accumulation of Antifungal Proteins and Hexoses Constitutes a Developmentally Controlled Defense Response during Fruit Ripening in Grape. *Plant Physiology*. 117, 465-472
- Saunders DGO, Breen S, Win J, Schornack S, Hein I, Bozkurt TO, Champouret N, Vleeshouwers VGAA, Birch PRJ, Gilroy EM, Kamoun S** (2012) Host Protein BSL1 Associates with *Phytophthora infestans* RXLR Effector AVR2 and the *Solanum demissum* Immune Receptor R2 to Mediate Disease Resistance. *The Plant Cell*. doi/10.1105/tpc.112.099861
- Saunders DGO, Win J, Cano LM, Szabo LJ, Kamoun S, Raffaele S** (2012) Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *PLoS ONE*. 1, e29847

- Schirawski J, Mannhaupt G, Münch K, Brefort T, Schipper K, Doehlemann G, Di Stasio M, Rösser N, Mendoza-Mendoza A, Pester D, Müller O, Winterberg B, Meyer E, Ghareeb H, Wollenberg T, Münsterkötter M, Wong P, Walter M, Stukenbrock E, Güldener U, Kahmann R** (2010) Pathogenicity Determinants in Smut Fungi Revealed by Genome Comparison. *Science*. 330, 546-548
- Schmidt SM, Panstruga R** (2011) Pathogenomics of fungal plant parasites: what have we learnt about pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-6
- Schneider DJ, Collmer A** (2010) Studying Plant-Pathogen Interactions in the Genomics Era: Beyond Molecular Koch's Postulates to Systems Biology. *Annual Reviews in Phytopathology*. 48, 457-479
- Schorneck S, Van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S, Huitema E** (2010) Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 107, 17421-17426
- Schulze-Lefert P, Panstruga R** (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science*. 16, 117-125
- Schwessinger B, Ronald PC** (2012) Plant Innate Immunity : Perception of Conserved Microbial Signatures. *Annual Reviews in Plant Biology*. 63, 451-482
- Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, Ntoukakis J, Jones A, Zipfel C** (2011) Phosphorylation-Dependent Differential Regulation of Plant Growth, Cell Death, and Innate Immunity by the Regulatory Receptor-Like Kinase BAK1. *PLoS Genetics*. 7, e1002046
- Seeholzer S, Tsuchimatsu T, Jordan T, Bieri S, Pajonk S, Yang W, Jahoor A, Shimizu KK, Keller B, Schulze-Lefert P** (2010) Diversity at the *Mla* Powdery Mildew Resistance Locus from Cultivated Barley Reveals Sites of Positive Selection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 497-509
- Segonzac C, Nimchuk ZL, Beck M, Tarr PT, Robatzek S, Meyerowitz EM, Zipfel C** (2012) The Shoot Apical Meristem Regulatory Peptide CLV3 Does Not Activate Innate Immunity. *The Plant Cell*. doi/10.1105/tpc.111.091264
- Segonzac C, Zipfel C** (2011) Activation of plant pattern-recognition by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 14, 54-61
- Selles B, Jacquot J-P, Rouhier N** (2010) Comparative genomic study of protein disulfide isomerases from photosynthetic organisms. *Genomics*. 97, 37-50
- Selosse M-A** (2008) Les champignons qui nourrissent les plantes: les associations mycorhiziennes. In: *Aux origines des plantes*, eds. Halle F, Fayard, Paris.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46, 941-950

- Silverstein KAT, Graham MA, Paape TD, VandenBosch KA** (2005) Genome Organization of More Than 300 Defensin-Like Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 138, 600-610
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S, Njau P, Herrera-Foessel, Singh PK, Singh S, Govindan V** (2011) The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. *Annual Reviews in Plant Biology*. 40, 465-481
- Sjödin A, Street NR, Sandberg G, Gustafsson P, Jansson S** (2009) The *Populus* Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. *New Phytologist*. 182, 1013-1025
- Skibbe DS, Doehlemann G, Fernandes J, Walbot V** (2010) Maize Tumors Caused by *Ustilago maydis* Require Organ-Specific Genes in Host and Pathogen. *Science*. 328, 89-92
- Soanes DM, Chakrabarti A, Paszkiewicz KH, Dawe AL, Talbot NJ** (2012) Genome-wide Transcriptional Profiling of Appressorium Development by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*. 8, e1002514
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, Jones JDG** (2007) The Downy Mildew Effector Proteins ATR1 and ATR13 Promote Disease Susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 19, 4077-4090
- Spanu PD** (2012) The Genomics of Obligate (and Nonobligate) Biotrophs. *Annual Reviews in Plant Biology*. 50, 5.1-5.19
- Spanu PD, Abbot JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, Stüber K, Ver Loren Van Themaat E, Brown JKM, Butcher SA, Gurr SJ, Lebrun M-H, Ridout CJ, Schulze-Lefert P, Talbot N – liste alphabétique de 48 auteurs – Panstruga R** (2010) Genome Expansion and Gene Loss in Powdery Mildew Fungi Reveal Tradeoffs in Extreme Parasitism. *Science*. 330, 1543-1546
- Spanu P, Kamper J** (2010) Genomics of biotrophy in fungi and oomycetes – emerging patterns. *Current Opinion in Plant Biology*. 13, 1-6
- Spoel SH, Dong X** (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews in Immunology*. 12, 89-100
- Spoel SH, Loake GJ** (2011) Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-7
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X** (2009) Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell*. 137, 860-872
- Stackman E** (1914) A study in cereal rusts, physiological races. *University of Minnesota Agricultural Experiment Station technical Bulletin*. 138, 1-56
- Staskawicz B** (2012) Effectors in Plant-Microbe Interactions: Past to Present. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.

- Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N** (1984) Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 81, 6024-6028
- Stergiopoulos I, De Wit PJGM** (2009) Fungal Effector Proteins. *Annual Reviews in Phytopathology.* 47, 233-263
- Sun W, Cao Y, Jansen KL, Bittel P, Boller T, Bent AF** (2012) Probing the *Arabidopsis* Flagellin Receptor: FLS2-FLS2 Association and the Contributions of Specific Domains to Signaling Function. *The Plant Cell.* 24, 1096-1113
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R** (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology.* 14, 1-9
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008) Plant Immunity requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science.* 321, 952-955
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F** (2003) Quantitative Nature of *Arabidopsis* Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas Syringae*. *The Plant Cell.* 15, 317-330
- Takken F, Goverse A** (2012) How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology.* 15, 1-10
- Takken F, Rep M** (2010) The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology.* 11, 309-314
- Tattersall DB, Van Heeswijck R, Hoj PB** (1997) Identification and Characterization of a Fruit-Specific, Thaumatin-Like Protein That Accumulates at Very High Levels in Conjunction with the Onset of Sugar Accumulation and Berry Softening Grapes. *Plant Physiology.* 114, 759-769
- Terauchi R, Yoshida K** (2010) Towards population genomics of effector-effector target interactions. *New Phytologist.* 187, 929-939
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408, 796-815
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ** (2011) Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell.* 23, 4-15
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R – 2 listes alphabétiques d'un total de 29 auteurs – Gianinazzi-Pearson V, Martin F** (2011) The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist.* 193, 755-769
- Tör M, Lotze MT, Holton N** (2009) Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany.* 60, 3645-3654

Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grogoriev, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L – liste alphabétique de 93 auteurs – Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van De Peer Y, Rokhsar D (2006) The Genome of Black Cottonwood *Populus trichocarpa* (Torr. et Gray). *Science*. 313, 1596-1604

Tsuda K, Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 13, 1-7

Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, Katagiri F (2009) Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLoS Genetics*. 5, e1000772

Tyler BM (2012) Entry of Oomycete and Fungal Effectors in Host Cells. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.

Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RHY – liste alphabétique de 44 auteurs – Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL (2006) *Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanism of Pathogenesis. *Science*. 313, 1261-1266

Valent B, Khang CH (2010) Recent advances in rice blast effector research. *Current Opinion in Plant Biology*. 13, 1-8

Van Damme M, Bozkurt TO, Cakir C, Schornack S, Sklenar J, Jones AME, Kamoun S (2012a) The Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans* Translocates the CRN8 Kinase into Host Plant Cells. *PLoS Pathogens*. 8, e1002875

Van Damme M, Cano LM, Oliva R, Schornack S, Segretin ME, Kamoun S, Raffaele S (2012b) Evolutionary and Functional Dynamics of oomycete Effector Genes. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, eds. F Martin, S Kamoun, Wiley-Blackwell edition.

Van Den Hooven HW, Van Den Burg HA, Vossen P, Boeren S, De Wit PJGM, Vervoort J (2001) Disulfide Bond Structure of the AVR9 Elicitor of the Fungal Tomato Pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a Cysteine Knot. *Biochemistry*. 40, 3458-3466

Van Der Hoorn, Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell*. 20, 2009-2017

Van Der Merwe MM, Kinnear MW, Barrett LG, Dodds PN, Ericson L, Thrall PH, Burdon JJ (2009) Positive selection in AvrP4 avirulence gene homologues across the genus *Melampsora*. *Proceedings of the Royal Society*. 276, 2913-2922

Van Der Wel H, Loeve K (1972) Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *European Journal of Biochemistry*. 31, 221-225

Van Esse HP, Van't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta KA, Van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, De Wit PJGM, Thomma BPHJ (2008) The *Cladosporium fulvum* Virulence Protein Avr2 Inhibits Host Proteases Required for Basal Defense. *The Plant Cell*. 20, 1948-1963

Van Kan JAL, Van Den Ackerveken GFJM, De Wit PJGM (1991) Cloning and characterisation of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 4, 52-59

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Reviews in Plant Biology*. 44, 135-162
- Van Loon LC, Van Strien EA** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55, 85-97
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF** (2009) Salicylic Acid, a Multifaced Hormone to Combat Disease. *Annual Reviews in Phytopathology*. 47, 177-206
- Voegelé RT, Hahn M, Mendgen K** (2009) The Uredinales: Cytology, Biochemistry, and Molecular Biology. In: *The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Eds. Esser K, Deising HB, Springer edition.
- Voegelé RT, Struck C, Hahn M, Mendgen K** (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 98, 8133-8138
- Wang C-IA, Guncar G, Forwood JK, Teh T, Catanzariti A-M, Lawrence GJ, Loughlin FE, Mackay JP, Schirra HJ, Anderson PA, Ellis JG, Dodds PN, Kobe B** (2007) Crystal Structures of Flax Rust Avirulence Proteins AvrL567-A and -D Reveal Details of the Structural Basis for Flax Disease Resistance Specificity. *The Plant Cell*. 19, 2898-2912
- Wang Q, Han C, Ferreira AO, Yu X, Ye X, Tripathy S, Kale SD, Gu B, Sheng Y, Sui Y, Wang X, Zhang Z, Cheng B, Dong S, Shan W, Zheng X, Dou D, Tyler BM, Wang Y** (2011) Transcriptional Reprogramming and Functional Interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR Effector Repertoire. *The Plant Cell*. 23, 2064-2086
- Wang Q, Li F, Zhang X, Zhang Y, Hou Y, Zhang S, Wu Z** (2011) Purification and Characterization of a CkTLP Protein from *Cynanchum komarovii* Seeds that Confers Antifungal Activity. *PLoS ONE*. 2, e16930
- Wang W, Barnaby JY, tada Y, Li H, Tor M, Caldelari D, Lee D-U, Fu X-D, Dong X** (2011) Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*. 470, 110-114
- Wang X, Zafian P, Choudhary M, Lawton M** (1996) The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 93, 2598-2602
- Wawra S, Agacan M, Boddey JA, Davidson I, Gachon CMM, Zanda M, Grouffaud S, Whisson SC, Birch PRJ, Porter AJ, van West P** (2012a) The avirulence protein 3a (AVR3a) from the potato pathogen *Phytophthora infestans*, forms homodimers through its predicted translocation region and does not specifically bind phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*. doi/10.1074/jbc.M112.395129
- Wawra S, Bain J, Durward E, De Bruijn I, Minor KL, Matena A, Lobach L, Whisson SC, Bayer P, Porter AJ, Birch PRJ, Secombes CJ, Van West P** (2012b) Host-targeting protein A (SpHtp1) from the oomycete *Saprolegnia parasitica* translocates specifically into fish cells in a tyrosine-O-sulphate-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 109, 2096-2101

- Wei C-F, Kvitko BH, Shimizu R, Crabill E, Alfano JR, Lin N-C, Martin GB, Huang H-C, Collmer A** (2007) A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 51, 32-46
- Wessling R, Schmidt SM, Micali CO, Knaust F, Reinhardt R, Neumann U, Ver Loren van Themaat E, Panstruga R** (2012) Transcriptome analysis of enriched *Golovinomyces orontii* haustoria by deep 454 pyrosequencing. *Fungal Genetics and Biology*. 49, 470-482
- Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J** (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews in Microbiology*. 10, 618-630
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, Van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PRJ** (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*. 450, 115-118
- Win J, Krasileva KV, Kamoun S, Shirasu K, Staskawicz BJ, Banfield MJ** (2012) Sequence Divergent RXLR Effectors Share a Structural Fold Conserved across Plant Pathogenic Oomycete Species. *PLoS Pathogens*. 1, e1002400
- Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva KV, Cano LM, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz BJ, Kamoun S** (2007) Adaptive Evolution Has Targeted the C-Terminal Domain of the RXLR Effectors of Plant Pathogenic Oomycetes. *The Plant Cell*. 19, 2349-2369
- Wise RP, Moscou MJ, Bogdanove AJ, Whitham SA** (2007) Transcript Profiling in Host-Pathogen Interactions. *Annual Reviews in Phytopathology*. 45, 329-369
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012) The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*. 1, 639-647
- Wulff BBH, Chakrabarti A, Jones DA** (2009) Recognition Specificity and Evolution in the Tomato-*Cladosporium fulvum* Pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22, 1191-1202
- Xue M, Yang J, Li Z, Hu S, Yao N, Dean RA, Zhao W, Shen M, Zhang H, Li , Liu L, Lei C, Xu X, Xing Y, Hsiang T, Zhang Z, Xu J-R, Peng Y-L** (2012) Comparative Analysis of the Genomes of Two Field Isolates of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genetics*. 8, e1002869
- Yaeno T, Li H, Chaparro-Garcia A, Schornack S, Koshiba S, Watanabe S, Kigawa T, Kamoun S, Shirasu K** (2011) Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108, 14682-14687
- Yamaguchi Y, Huffaker A** (2011) Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 1-7
- Yamaguchi Y, Barona G, Ryan CA, Pearce G** (2011) GmPep914, an Eight-Amino Acid Peptide Isolated from Soybean Leaves, Activates Defense-Related Genes. *Plant Physiology*. 156, 932-942

- Yang B, Sugio A, White FF** (2006) Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight on rice. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 103, 10503-10508
- Yang X, Kalluri UC, DiFazio SP, Wullschleger SD, Tschaplinski TJ, Cheng Z-M, Tuskan GA** (2009) Poplar Genomics: State of the Science. *Critical reviews in Plant Science.* 28, 285-308
- Yeung ATY, Gellatly SL, Hancock REW** (2011) Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 68, 2161-2176
- Yin TM, Difazio SP, Gunter LE, Jawdy SS, Boerjan W, Tuskan GA** (2004) Genetic and physical mapping of *Melampsora* rust resistance in *Populus* and characterization of linkage disequilibrium and flanking genomic sequence. *New Phytologist.* 164, 95-105
- Yoshino K, Irieda H, Sugimoto F, Yoshioka H, Okuno T, Takano Y** (2012) Cell Death of *Nicotiana benthamiana* Is Induced by Secreted Protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and Is Suppressed by a Homologue of CgDN3. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 25, 625-636
- Yu M, Yun B-W, Spoel SH, Loake GJ** (2012) A sleight ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion in Plant Biology.* 15, 1-7
- Yue J-X, Meyers BC, Chen J-Q, Tian D, Yang S** (2012) Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytologist.* 193, 1049-1063
- Yun B-W, Feechan A, Yin M, Saidi NBB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang J-G, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA, Loake GJ** (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature.* 478, 264-268
- Zaslhoff M** (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415, 389-395
- Zeng W, Melotto M, He SY** (2010) Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current Opinion in Biotechnology.* 21, 1-5
- Zhao JP, Su XH** (2010) Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*. *Planta.* 232, 949-962
- Zheng X-Y, Spivey NW, Zeng W, Liu P-P, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X** (2012) Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host & Microbe.* 11, 587-596
- Zhou H, Lin J, Johnson A, Morgan RL, Zhong W, Ma W** (2011) *Pseudomonas syringae* Type III Effector HopZ1 Targets a Host Enzymes to Suppress Isoflavone Biosynthesis and Promote infection in Soybean. *Cell Host & Microbe.* 9, 177-186
- Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ** (1994) Enhanced Protection Against Fungal Attack by Constitutive Co-expression of Chitinase and Glucanases Genes in Transgenic Tobacco. *Nature Biotechnology.* 12, 807-811

Zipfel C, Robatzek S (2010) Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi... ? *Plant Physiology*. 154, 551-554

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G (2006) Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*. 125, 749-760

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*. 428, 764-767

Annexes

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 Article n°8, Petre *et al.*, Acte du séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E, 2011
- Annexe 2 Article n°9, Dowkiw *et al.*, Acte de congrès USDA, soumis
- Annexe 3 Bilan d'activité (communication, formation, ...)

Annexe 1

Article n° 8 : Les apports de la génomique pour l'étude des familles multigéniques : exemple des thaumatin-like proteins (TLPs) chez le peuplier.

Benjamin Petre, Ian Major, Pascal Frey, Francis Martin, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

Article publié le 20 janvier 2011 dans les actes du séminaire de l'école doctorale RP2E.
ISBN 2-9518564-9-0

LES APPORTS DE LA GENOMIQUE POUR L'ETUDE DES FAMILLES MULTIGENIQUES : EXEMPLE DES THAUMATIN-LIKE PROTEINS (TLPs) CHEZ LE PEUPLIER.

B. Petre¹, I. Major², P. Frey¹, F. Martin¹, N. Rouhier¹, S. Duplessis¹

¹Laboratoire Interactions Arbres/Micro-organismes, UMR 1136 Nancy Université/INRA, Nancy, France

²Plant Research Laboratory, 122 Plant Biology Laboratory, Michigan State University, East Lansing, Michigan, 48864, USA

Résumé. Les progrès réalisés dans les domaines du séquençage de l'ADN et de la bio-informatique ont permis l'essor de la génomique au cours de la dernière décennie. Cela a permis l'analyse systématique de familles multigéniques au sein des génomes de plantes où elles sont nombreuses et importantes. Combinées aux analyses de transcriptomes à haut-débit, ces approches offrent une vision intégrée de l'évolution, de l'expression et des fonctions biologiques des familles étudiées. Les thaumatin-like proteins (TLPs) sont des protéines à fort pouvoir sucrant et allergénique, mais qui sont plus particulièrement étudiées chez les plantes pour leur sur-expression et leur activité antimicrobienne lors d'infections par des agents pathogènes. Leur forte expansion en familles multigéniques chez les plantes supérieures culmine chez le peuplier avec plus de 40 gènes identifiés. Ces dernières années, plusieurs études tirant profit de la disponibilité du génome de cet arbre ont mis en évidence des groupes de gènes *TLPs* impliqués dans les réactions de défense du peuplier. Certains de ces gènes présentent des caractéristiques originales de par leur structure ou leur appartenance spécifique aux plantes pérennes.

LA GENOMIQUE

Les avancées technologiques considérables de ces dernières années ont rendu possible le séquençage massif de l'ADN de nombreuses espèces. La disponibilité des génomes a alors ouvert la voie aux approches dites de génomique comparative (analyse structurale des génomes et des séquences codantes entre espèces ou individus) et de génomique fonctionnelle (étude de l'expression de l'ensemble des gènes d'un génome donné, caractérisation des fonctions mises à jour).

1. La génomique structurale : le verrou technologique du séquençage saute

En génomique, le séquençage consiste à déterminer l'ordre linéaire des nucléotides (Adénine, Thymines, Cytosine, ou Guanine) au sein de la ou des macromolécules d'ADN qui composent le génome. Cette étape est longtemps restée l'élément limitant du fait de la taille importante des génomes comparée aux capacités de séquençage des technologies de première génération. L'avènement des technologies de séquençage de seconde génération (pyroséquençage 454, Illumina, etc) a permis de faire sauter ce verrou technologique et d'ouvrir la voie à la génomique dans tous les domaines du vivant (Figure 1) ^[1]. En combinant le séquençage à haut-débit aux avancées notables de la bio-informatique, on peut aujourd'hui dresser l'inventaire du contenu en gènes d'une espèce donnée. Actuellement, les génomes de près de 4000 espèces ont été séquencés (dont quelques dizaines d'eucaryotes seulement) et l'évolution technologique en cours préfigure une augmentation exponentielle de ce nombre dans la prochaine décennie ^[2].

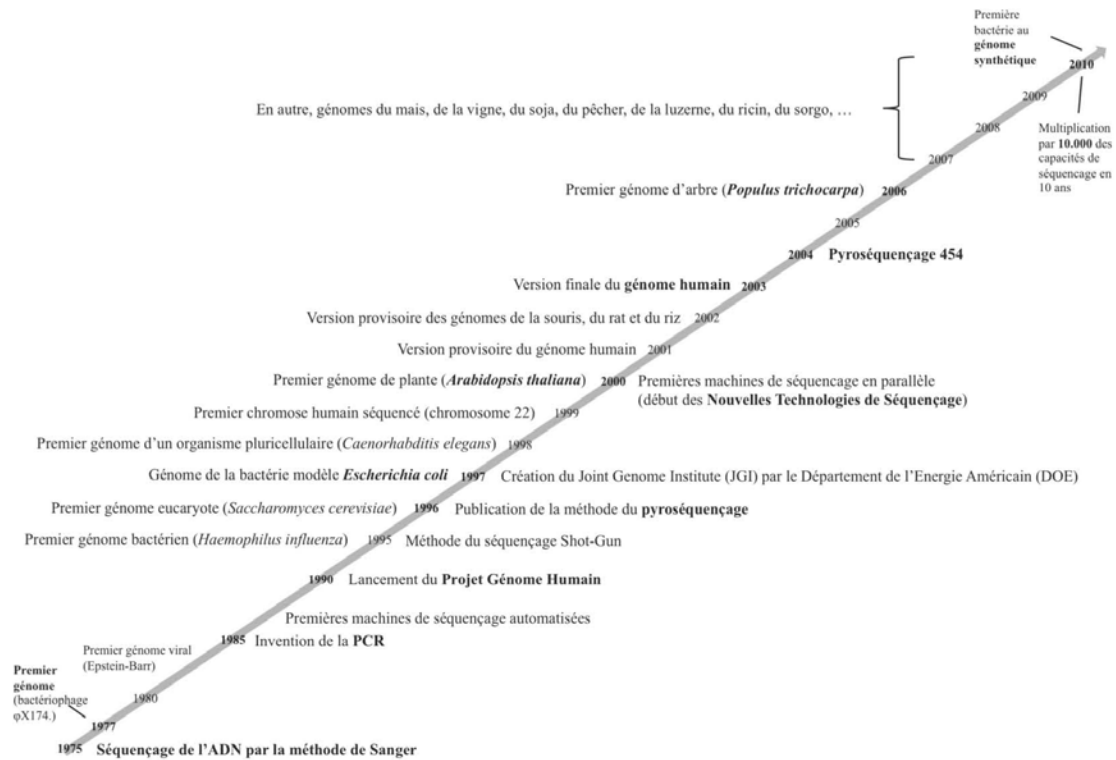


Figure 1. Chronologie des événements fondateurs de la génomique moderne.

A gauche, les principaux génomes séquencés depuis l'invention du séquençage de l'ADN, à droite les principales avancées en génomique et plus particulièrement en matière de technologie de séquençage.

2. La génomique comparative : une clef de compréhension pour l'étude des familles multigéniques

La disponibilité du génome d'une espèce permet de dresser un catalogue exhaustif de son contenu en gènes, et de définir des fonctions *a priori* redondantes organisées en familles multigéniques. Il est ainsi possible de connaître pour une famille multigénique donnée l'ensemble de ses composants (gènes) et leurs caractéristiques (localisation, organisation, diversification des séquences codantes). Ces informations, lorsqu'elles sont disponibles à l'échelle de plusieurs espèces représentatives de la diversité du vivant, permettent de retracer l'histoire d'une famille de gènes au cours de l'évolution^[3]. En recoupant les données phylogénétiques avec les informations fonctionnelles apportées par la biologie moléculaire et la biochimie, il est possible de décrypter l'évolution et la diversification de certaines fonctions au travers des espèces. Des approches statistiques d'évolution moléculaire permettent également d'estimer, au sein d'une famille de gènes, les pressions de sélection naturelle qui ont favorisées la diversification ou la conservation de leurs membres.

3. La génomique fonctionnelle : l'analyse des transcriptomes à haut-débit

La disponibilité des génomes a permis d'établir des outils d'analyse à haut-débit du niveau d'expression des gènes (transcriptome) tels que les microréseaux d'ADN (puces à oligonucléotides génome entier). Ces derniers permettent de connaître le niveau d'expression transcriptionnel de l'ensemble des gènes d'une espèce de manière quantitative, dans une condition et/ou dans un tissu donné. Les dernières technologies

de capture par microdissection laser permettent même d'accéder au transcriptome d'un seul type cellulaire (par exemple les stomates des feuilles). Dans le contexte des interactions plantes/agents pathogènes, les puces à ADN ont été largement utilisées lors de cinétiques d'infection pour mettre en évidence les reprogrammations génétiques menant à la mise en place de réactions de défense chez l'hôte ^[4]. C'est notamment par le biais de ce type d'analyses que les TLPs ont été décrites parmi les gènes les plus fortement exprimés durant la mise en place des réactions de défense.

LES TLPs : FONCTIONS ET EVOLUTION

1. Les TLPs : des protéines sucrantes, allergéniques et antimicrobiennes

Les thaumatines sont des protéines à fort pouvoir sucrant isolées en 1972 dans le fruit du katemfe (*Thaumatococcus danielli* [Benth]), buisson de la forêt tropicale d'Afrique de l'ouest ^[5]. Les thaumatines sont quasiment les seules protéines à être actuellement utilisées dans l'industrie agroalimentaire comme édulcorants/exhausteurs de goût. Elles sont commercialisées à ce titre sous le nom de Talin[®].

Au sein des autres espèces, on appelle par analogie thaumatin-like proteins (TLPs) les protéines qui présentent une forte homologie de séquence primaire avec les thaumatines (Figure 2). Chez les plantes, de nombreuses TLPs s'accumulent dans le pollen et certains fruits comestibles comme la pomme, le kiwi ou la banane, ce qui a contribué à mettre en évidence leurs propriétés allergéniques chez l'humain ^[6].

En phytopathologie, les TLPs sont parmi les protéines les plus fortement accumulées dans les organes de plantes infectés par des agents pathogènes tels que les insectes, oomycètes, champignons, bactéries ou virus. A ce titre, les phytopathologistes les ont renommées PR-5 (5^{ème} famille dans le système de classification dit 'pathogenesis-related', qui regroupe sous la dénomination 'PR' 17 familles de protéines qui s'accumulent chez les plantes lors des infections) ^[7]. Au niveau fonctionnel, des dizaines de TLPs d'espèces différentes ont été caractérisées. Les fonctions les plus décrites dans la littérature sont les activités antimicrobiennes, la dégradation des glucanes (qui entrent dans la composition des parois microbiennes) et l'inhibition d'enzymes de dégradations d'agents pathogènes (amylase, trypsine, xylanase) ^[8].

2. Répartition des TLPs au sein du vivant

Au cours des 30 années qui ont suivi la découverte des thaumatines chez le katemfe, les TLPs ont extensivement été identifiées et étudiées chez les plantes, depuis les algues vertes jusqu'aux plantes supérieures. Durant la dernière décennie, des TLPs ont également été identifiées chez des champignons et des animaux de l'embranchement des arthropodes et des nématodes ^[9-11]. Les fonctions exactes des TLPs chez les champignons et les animaux sont encore méconnues. Cependant, un rôle dans la dégradation de composants des parois fongiques permettant la sporulation a été démontré chez le champignon *Lentinula edodes* ^[9], suggérant une fonction développementale chez ce dernier. D'autre part, chez le coleoptère *Tribolium castaneum* il a récemment été montré que certaines TLPs sur-exprimées lors de la réponse immunitaire possèdent des propriétés antimicrobiennes ^[12], ce qui suggère que les TLPs animales pourraient être impliquées dans les réactions de défense face aux agents pathogènes microbiens comme chez les plantes. Jusqu'à présent, aucun gène *TLP*

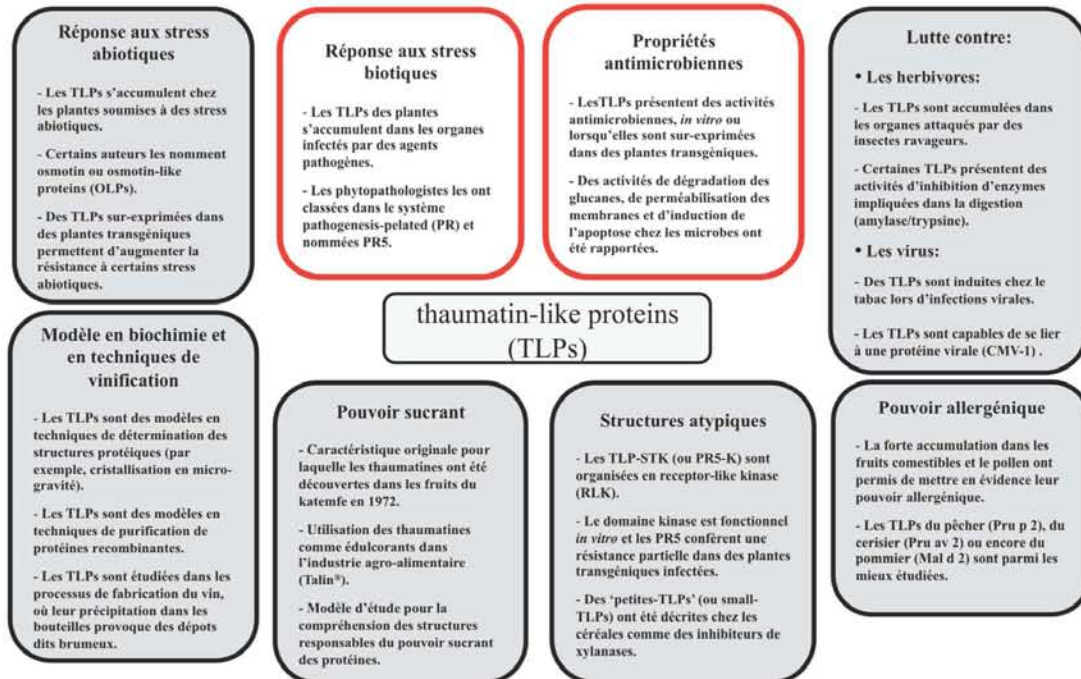


Figure 2. Aspects multiples des recherches portant sur les TLPs.

Huit cadres thématiques résument les principaux axes de recherche se focalisant sur les TLPs, ainsi que la nomenclature spécifiquement utilisée par les communautés scientifiques respectives. Les deux principaux champs d'investigation en lien avec la phytopathologie et discutés dans le texte sont présentés dans les cadres rouges.

n'a été identifié chez les archéobactéries et les procaryotes, plaçant leur apparition après l'émergence des eucaryotes durant l'évolution.

3. Evolution des TLPs et diversification chez les plantes terrestres

Le nombre important de génomes rendus disponibles ces dernières années a permis de confirmer l'absence de TLPs chez les animaux dits 'supérieurs' tels que les oiseaux ou les mammifères. Il semblerait donc qu'au sein du règne animal, l'évolution de cette famille se soit limitée aux embranchements dits 'ancestraux' qui n'ont pas développés de système immunitaire complexe. De façon similaire, les TLPs forment de petites familles multigéniques chez les champignons, avec un à trois gènes identifiés dans les génomes des basidiomycètes *Laccaria bicolor* (symbiote ectomycorhizien) et *Melampsora larici-populina* (l'agent de la rouille foliaire du peuplier).

Chez les plantes en revanche, les TLPs ont évolué en grandes familles multigéniques, passant d'un seul gène chez les algues vertes à plus de 40 chez le peuplier^[13]. Au delà de cette augmentation conséquente, une diversification des structures, des fonctions et des localisations dans les tissus végétaux ont vraisemblablement aussi eu lieu.

Les arbres présentent une spécificité vis à vis des plantes annuelles qui est la croissance à long terme des individus. Cela implique entre autre une capacité limitée des populations à faire face à l'évolution rapide de virulences chez les agents pathogènes. Bien que des études aient montré que les mécanismes de défense des arbres face aux agents pathogènes sont d'un point de vue moléculaire fortement similaires à ceux des plantes annuelles, les mécanismes permettant aux arbres de compenser leur handicap adaptatif lié à leur temps de régénération restent à élucider^[14-15].

4. Les TLPs chez les arbres

Historiquement, les TLPs ont été étudiées chez plusieurs arbres modèles et/ou d'intérêts comme le sapin de Douglas, le pin, le cèdre, le châtaigner et le peuplier. Plus récemment, plusieurs TLPs ont également été identifiées dans les fruits du pommier, du pêcher, du poirier ou encore du cerisier [8]. A notre connaissance aucune propriété sucrante n'a été rapportée à ce jour pour ces TLPs, qui présentent en revanche comme pour les plantes annuelles des propriétés allergéniques, antimicrobiennes, ainsi que des activités enzymatiques de type glucanases [16]. A l'instar des plantes modèles annuelles, les TLPs d'arbres sont accumulées dans les organes infectés par des agents pathogènes. Des approches transcriptomiques réalisées sur plusieurs pathosystèmes (hêtre/*Phytophthora*, pin/*Cronartium*, sapin de Douglas/*Phenillus*) ont permis d'observer l'accumulation de transcrits correspondants à des TLPs dans les organes infectés [8]. Dans le cadre de l'interaction pin/*Cronartium* (agent de la rouille du pin), des approches de protéomique ont également mis en évidence l'accumulation de ces protéines dans les aiguilles de pin infectées [17].

Durant ces dernières années, plusieurs génomes d'arbres ont été séquencés (peuplier, 2006; vigne, 2007; pêcher, 2009) (Figure 1) [3]. La disponibilité des génomes de ces 3 espèces ouvre la voie aux analyses dites post-génomiques sur des espèces de plantes pérennes. Le catalogue exhaustif des gènes *TLPs* chez ces espèces a pu être établi (peuplier : 42, vigne : 27, pêcher : 28) [13]. Mise à part pour le peuplier qui présente une importante expansion de cette famille (Figure 3A) [18], les nombres de gènes *TLPs* observés sont similaires à ceux recensés chez les plantes annuelles (par exemple 22 pour *Arabidopsis thaliana*). Pourquoi le peuplier possède autant de TLPs ? Cette augmentation pourrait-elle être liée à l'apparition de nouvelles fonctions ? Les analyses post-génomiques menées ces dernières années chez le peuplier permettent d'établir des pistes pour répondre à ces questions.

EXEMPLE DES TLPs DU PEUPLIER : L'APPORT DE LA GENOMIQUE

Le peuplier (*Populus trichocarpa* 'Nisqually-1') est le premier arbre dont le génome a été séquencé et rendu public en 2006 [18]. Cela a permis d'asseoir le peuplier comme espèce forestière modèle et a ouvert la voie aux analyses phylogénétiques de familles de gènes ainsi que l'analyse à haut débit du transcriptome de cet arbre [19]. L'interaction peuplier/*M. larici-populina* (maladie de la rouille foliaire) est un pathosystème forestier modèle émergent dans ce contexte post-génomique [15]. Plusieurs analyses du transcriptome de feuilles de peupliers infectées par différentes espèces de *Melampsora* spp. ont révélé l'induction de l'expression d'un grand nombre de *TLPs* conjointement à la mise en place de réactions de défense dans les tissus foliaires attaqués.

1. Les TLPs au sein du génome du peuplier

L'annotation récente des gènes *TLPs* au sein du génome du peuplier a permis de valider 42 modèles de gènes parmi les 59 initialement prédits [13]. La comparaison phylogénétique des 42 séquences protéiques correspondantes a révélé quatre clades bien définis (Figure 3b). Les 42 modèles de gènes présentent une large dispersion au sein du génome, excepté pour 11 d'entre eux qui sont organisés en tandem au sein d'un cluster (appelé 'cluster TLP') sur la séquence du scaffold 1 du génome (Figure 3c). Cette

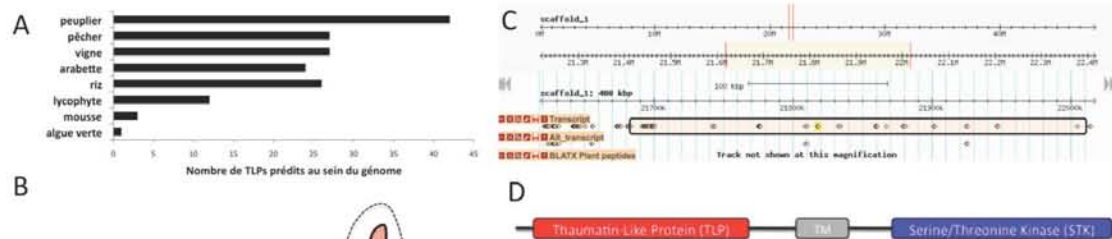


Figure 3. Les TLPs chez le peuplier.

A. Graphique présentant l'abondance des TLPs dans les génomes de plantes, depuis les algues vertes jusqu'aux arbres. **B)** Arbre phylogénétique établi à partir des 42 séquences protéiques complètes prédites dans le génome du peuplier. Les zones colorées correspondent aux TLPs dont les transcrits sont accumulés préférentiellement lors de la résistance complète (rouge) ou partielle (orange) aux *Melampsora* spp.. La zone en pointillés désigne les 4 TLP-STKs identifiées. L'astérisque indique le cluster TLP. **C)** Capture d'écran de la région du scaffold 1 du génome qui correspond au cluster TLP [<http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/poplar/>]. **D)** Organisation atypique des TLP-STKs chez le peuplier; TM : domaine transmembranaire.

organisation semble découler d'évènements de duplications/transpositions récents du fait de la proximité phylogénétique de ses membres et de la prédominance d'éléments transposables dans cette région du génome. De façon intéressante, dans la phylogénie des TLPs eucaryotes, les membres de ce cluster sont regroupés dans un même clade composé essentiellement de séquences d'arbres^[13]. Des investigations récentes couplant analyses microscopiques et protéomiques ont mis en évidence l'accumulation de deux protéines de ce cluster dans les tissus conducteurs de peupliers en condition de croissance et en l'absence de stress^[20]. D'autre part, l'analyse des pressions de sélection naturelle s'appliquant sur les TLPs de peuplier a permis de mettre en évidence une évolution sous pression de sélection dite diversifiante ou positive pour 10 des membres du cluster TLP^[21]. Ces gènes présentent ainsi un niveau d'évolution accéléré, plus précisément localisé au niveau des codons correspondants à des acides aminés exposés à d'éventuelles protéases dans leur structure. Globalement, ces observations suggèrent fortement que les TLPs de ce cluster pourraient participer à une défense pré-formée contre les agents pathogènes qui infectent ou agissent au niveau de la sève.

Quatre des 42 TLPs identifiées chez le peuplier présentent une structure atypique, qui consiste en une fusion du domaine TLP dans la région N-terminale avec un domaine sérine/thréonine kinase (STK) dans la partie C-terminale, séparée par un domaine transmembranaire (Figure 3d). Ce type d'organisation appelé TLP-STK ou PR5K a déjà été rapporté chez *A. thaliana* et la fonctionnalité du domaine kinase a été démontrée *in vitro*^[22]. Ce type de structure, peu répandu au sein du vivant, pourrait correspondre à l'évolution d'une protéine de défense en un récepteur de type receptor-like kinase (RLK), impliqué dans des mécanismes d'identification et de signalisation des agents pathogènes plutôt que dans leur destruction^[7].

2. L'interaction peuplier/*Melampsora* : un pathosystème forestier modèle dans l'ère post-génomique

La disponibilité du génome de *P. trichocarpa* a permis d'explorer les réponses spécifiques du peuplier à divers stress biotiques ou abiotiques en ciblant des organes ou des conditions environnementales particulières à l'aide des outils d'analyse

d'expression génique à haut-débit. L'interaction biotrophe peuplier/*Melampsora* est à ce titre un pathosystème modèle. En effet, de nombreuses combinaisons cultivars/pathovars qui correspondent à des interactions compatible/incompatibles clairement définies sont disponibles et aisément cultivables en laboratoire ^[15].

Premièrement, l'interaction compatible entre la plante et l'agent pathogène. Le champignon se développe rapidement de façon optimale, causant les symptômes de la rouille foliaire avec l'émergence de pustules orangées sur la face inférieure des feuilles (spores asexuées nouvellement formées). Le développement du champignon et les symptômes observés de la maladie peuvent cependant être diminués en raison de réactions de défenses tardives mises en place par la plante (on parle alors de résistance partielle). Deuxièmement, l'interaction incompatible entre la plante et l'agent pathogène. La reconnaissance précoce du champignon par l'hôte mène à la mise en place d'importantes réactions de défenses qui stoppent précocément le développement du champignon. Aucun symptôme de la maladie ne sont observables (on parle de résistance 'hôte-spécifique' ou complète).

3. L'accumulation des TLPs durant la résistance du peuplier à *Melampsora*

Plusieurs analyses transcriptomiques portant sur les différents aspects de la résistance partielle ou complète du peuplier à la rouille foliaire ont permis de mettre en évidence une très forte accumulation de transcrits correspondants à des TLPs (14 des 42 prédits dans le génome) ^[15]. De façon intéressante, la compilation de ces données de transcriptomique a révélé des clades de gènes *TLPs* de peuplier dont l'expression des transcrits est spécifiquement induite en réponse à la rouille ^[13]. Certains clades présentent une régulation spécifique lors de la résistance complète précoce (interaction incompatible) alors que d'autres sont majoritairement attribuables à des réactions de défense tardives (interactions compatibles) (Figure 3b). La majorité des membres du cluster TLP présente une régulation lors de la mise en place d'une résistance partielle à la rouille, suggérant une fonction associée à ce type de résistance.

CONCLUSION

La génomique est une discipline en plein essor qui forme une base solide pour l'analyse des familles multigéniques, notamment pour des espèces difficiles à manipuler en laboratoire comme les arbres. Les études menées ces dernières années sur les TLPs du peuplier ont grandement bénéficiées de la disponibilité de son génome. Elles ont notamment permis de distinguer des clades de TLPs impliqués dans les réactions de défense, dont certains semblent spécifiques des plantes pérennes, comme le cluster TLP chez le peuplier. Cette appartenance propre au peuplier, associée aux traces d'évolution accélérée, à l'accumulation d'éléments mobiles dans les régions dupliquées et de régulation lors d'infection par les rouilles *Melampsora* spp. sont autant d'indices qui identifient les membres de ce cluster TLP comme d'excellents candidats pour l'étude de nouvelles fonctions de défense chez les arbres.

REFERENCES

- [1] Metzker M, *Sequencing technologies – the next generation*, Nat Rev Genet, 11 (2010), 31-46.
- [2] Venter C, *Multiple personal genome await*, Nature, 464 (2010), 676-676.
- [3] Paterson A, Freeling M, Tang H, Wang X, *Insight from the Comparison of Plant Genome Sequences*, Annu Rev Plant Biol, 61 (2010), 349-372.
- [4] Eulgem T, *Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome*, Trends Plant Sci, 10 (2004), 71-78
- [5] Van der Wel H, Loeve K, *Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from Thaumatooccus daniellii Benth*, Eur J Biochem, 31 (1972), 221-225.
- [6] Hoffmann-Sommergruber K, *Plant Allergens and Pathogenesis-Related Proteins*, Int Arch Allergy Immunol, 122 (2000), 155-166.
- [7] Van Loon L, Rep M, Pieterse C, *Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants*, Annu Rev Phytopathol, 44 (2006), 135-162.
- [8] Liu J, Sturock R, Ekramoddoullah A, *The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression toward biological function*, Plant Cell Rep, 29 (2010), 419-436
- [9] Sakamoto Y, Watanabe H, Nagai M, Nakade K, et al., *Lentinula edodes tlg1 Encodes a Thaumatin-Like Protein That Is Involved in Lentinan Degradation and Fruiting Body Senescence*, Plant Physiol, 141 (2006), 793-801.
- [10] Brandazza A, Angeli S, Tegoni M, Cambillau C, et al., *Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals*, FEBS Letters, 572 (2004), 3-7.
- [11] Shatters R, Boykin L, Lapointe S, Hunter W, et al., *Phylogenetic and Structural Relationships of the PR5 Gene Family Reveal an Ancient Multigene Family Conserved in Plant and Select Animal Taxa*, J Mol Evol, 63 (2006), 12-29
- [12] Altincicek B, Knorr E, Vilcinskas A, *Beetle immunity, Identificaiton of immune-inducible genes from the model insect Tribolium castaneum*, Dev Comp Immunol, 32 (2008), 585-595.
- [13] Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S, *Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar*, BMC Plant Biol, Manuscrit accepté (février 2011).
- [14] Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, et al., *Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust Melampsora larici-populina*, Plant Physiol, 144 (2007), 347-366.
- [15] Duplessis S, Major I, Martin F, Séguin A, *Poplar and Pathogen Interactions: Insights from Populus Genome-Wide Analyses of Resistance and Defense Gene families and Gene Expression Profiling*, Crit Rev Plant Sci, 28 (2009), 309-334.
- [16] Menu-Bouaouiche L, Vriet C, Peumans W, Barre A, et al., *A molecular basis for the endo- β 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits*, Biochimie, 83 (2003), 123-131.
- [17] Liu J, Zamani A, Ekramoddoullah A, *Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine*, Planta, 231 (2010), 637-651.
- [18] Tuskan G, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, et al., *The Genome of Black Cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray)*, Science, 313 (2006), 1596-1603.

Annexes

Séminaire 2011 de l'Ecole Doctorale RP2E « Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement »,
Nancy, 20 janvier 2011- ISBN 2-9518564-9-0

[19] Yang X, Kalluri U, DiFazio S, Wullschleger S, et al., *Poplar Genomics: State of the Science*, Crit Rev Plant Sci, 28 (2009), 285-308.

[20] Dafoe N, Gowen B, Constabel C, *Thaumatococcus-like proteins are differentially expressed and localized in phloem tissues of hybrid poplar*, BMC Plant Biol, 10 (2010), 191.

[21] Zhao J, Su X, *Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like protein of Populus trichocarpa*, Planta, 232 (2010), 949-962.

[22] Wang X, Zafian P, Choudhary M, Lawton M, *The PR5K receptor protein kinase from Arabidopsis thaliana is structurally related to a family of plant defense proteins*, Proc Natl Acad Sci, 93 (1996), 2598-2602.

Annexe 2

Article n° 9 : Breeding poplars with durable resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust: a multidisciplinary approach to understand and delay pathogen adaptation.

A Dowkiw, Jorge V, Villar M, Voisin E, Guérin V, Faivre-Rampant P, Bresson A, Bitton F, Duplessis S, Frey P, **Petre B**, Guinet C, Xhaard C, Fabre B, Halkett F, Plomion C, Lalanne C, Bastien C

Article soumis pour publication par l'USDA Forest Service dans les actes du congrès *Disease and insect resistance in forest trees conference* (Oregon, Etats-Unis, 2011)

Breeding poplars with durable resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust: a multidisciplinary approach to understand and delay pathogen adaptation.

A. Dowkiw¹, V. Jorge¹, M. Villar¹, E. Voisin¹, V. Guérin¹, P. Faivre-Rampant²,
A. Bresson², F. Bitton²; S. Duplessis³, P. Frey³, B. Petre³, C. Guinet³, C. Xhaard³,
B. Fabre³, F. Halkett³, C. Plomion⁴, C. Lalanne⁴ and C. Bastien¹

Abstract (extended)

During the last decades, European poplar breeders learned the hard way that *Melampsora larici-populina* (commonly abbreviated as *Mlp*, fig. 1) has an impressive adaptive potential (McDonald and Linde 2002). This fungal pathogen defeated all the deployed cultivars carrying qualitative (*i.e.* complete) resistances inherited from the American Eastern black cottonwood *Populus deltoides* in less time than needed to grow a poplar tree.



Figure 1 – Sporulating *Mlp* uredinia on the abaxial side of a *P. deltoides* x *P. nigra* cv. 'Robusta' poplar leaf (Photo by A.D.).

Populus deltoides is a key species for poplar breeding and growing in Europe. As an illustration, 90% of the cultivars sold by nurseries to growers in 2009 in France were interspecific hybrids of two types: *P. deltoides* x *P. trichocarpa* (*i.e.* interamerican hybrids) or *P. deltoides* x *P. nigra* (*i.e.* euramerican hybrids, *P. nigra* being a European species) (French Ministry of Agriculture – DGPATT – 2009 national statistics of forest reproductive material sales). Of the three parental species involved, *P. deltoides* is the only one where we ever found qualitative resistances to *Mlp*. Moreover, hybrid vigour (*i.e.* positive heterosis for growth traits) is generally high in these cultivars. Unfortunately, most of the hybrid material deployed over the last 30 years exhibited high rust susceptibility once the one or two major resistance genes inherited from *P. deltoides* were defeated.

The present situation is as follows: (i) all of the 44 clones found in the French registry of poplar cultivars, except two cultivars involving the non-host species *P. alba*, are susceptible to *Mlp*, and (ii) from 1990 to 2004, the proportion of immune clones in the INRA *P. deltoides* breeding material decreased from 45 % to 2 % in our nursery in Orléans (fig. 2).

¹ INRA, UR0588 AGPF, 45075 Orléans Cedex 2, France

² INRA, UMR1165 URGV, 91057 Evry Cedex, France

³ INRA UMR1136 IAM, 54280 Champenoux, France

⁴ INRA, UMR1202 BIOGECO, 33612 Cestas Cedex, France

Corresponding author: arnaud.dowkiw@orleans.inra.fr.

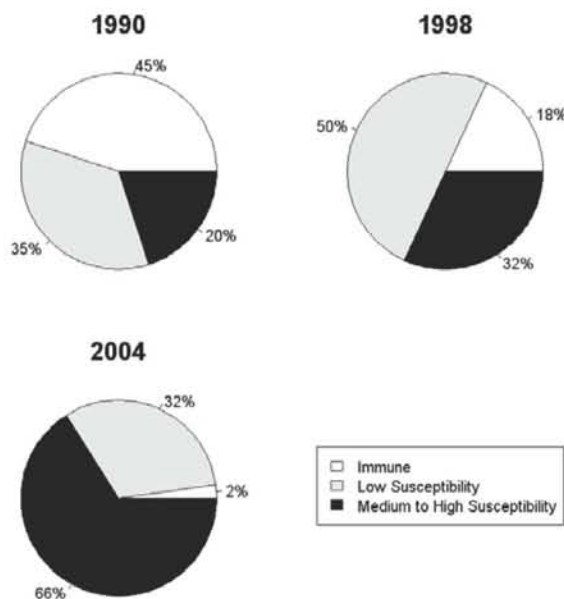


Figure 2 - Evolution of *Mlp* rust susceptibility from 1990 to 2004 in a breeding collection of 545 *P. deltoides* clones evaluated under natural rust infection at INRA Orléans (France).

Breeding for quantitative resistance (QR) was considered a reasonable option as it is often described as an *a priori* more durable strategy. Although significant genetic variability was found for slow rusting traits in laboratory inoculation experiments and for field resistance under natural rust pressure in the three considered poplar species and their hybrids (Pinon 1992; Pichot and Teissier du Cros 1993; Lefèvre *et al.* 1994; Lefèvre *et al.* 1998; Dowkiw *et al.* 2003), three major results raised doubts on this optimistic point of view. First, elucidating the genetic determinism of QR in *P. deltoides* x *P. trichocarpa* hybrid progenies essentially yielded a few loci with major effects (Dowkiw and Bastien 2004) while small effect QTLs were either rare or hard to detect and often exhibited strain specificity (Jorge *et al.* 2005, fig. 3a). Second, quantitative and qualitative resistances did not appear to be completely independent as most identified defeated qualitative resistances inherited from *P. deltoides*, happened to have statistical (possibly residual) effects on QR against virulent strains of the pathogen (Dowkiw and Bastien 2007, fig. 4). Third, *Mlp* strains able to completely defeat a major QR factor inherited from *P. trichocarpa* have been identified before any commercial deployment of this resistance factor (Dowkiw *et al.* 2010).

Based on these considerations, poplar breeders and pathologists developed a broad holistic approach to understand the factors governing the durability of resistance, from genes to landscape, in order to conceive new breeding and deployment strategies.

Functional genomics of the poplar - *Mlp* interaction

Following Eenink (1976) we believe that “the stability [i.e. the durability] of resistance is determined by the genetics of host-parasite relationships and not by the genetics of resistance. Quantity as well as quality of resistance and pathogenicity genes may be important. Monogenic and polygenic resistances can be stable or unstable”. Consequently, many efforts are made to elucidate the functions of both qualitative and quantitative resistances and plant and rust geneticists try to bring the knowledge about the host-pathogen interaction at the same level for both protagonists.

Genes with strong effects being the easiest ones to study and to follow among pedigrees, an integrated approach combining quantitative genetics, transcriptomics and proteomics was conducted on three major loci: R_I and Mer , two qualitative resistances inherited from *P. deltoides* defeated by virulences 1 and 7 of the pathogen, respectively, and R_{US} , a major QR factor inherited from *P. trichocarpa* with strong effect on uredinia size. R_{US} and R_I were identified at INRA (Dowkiw and Bastien 2004) whereas Mer was identified by a Belgian team (Cervera *et al.* 1996). All outputs from this combined approach led to the same conclusion of similarities between qualitative and quantitative resistances.

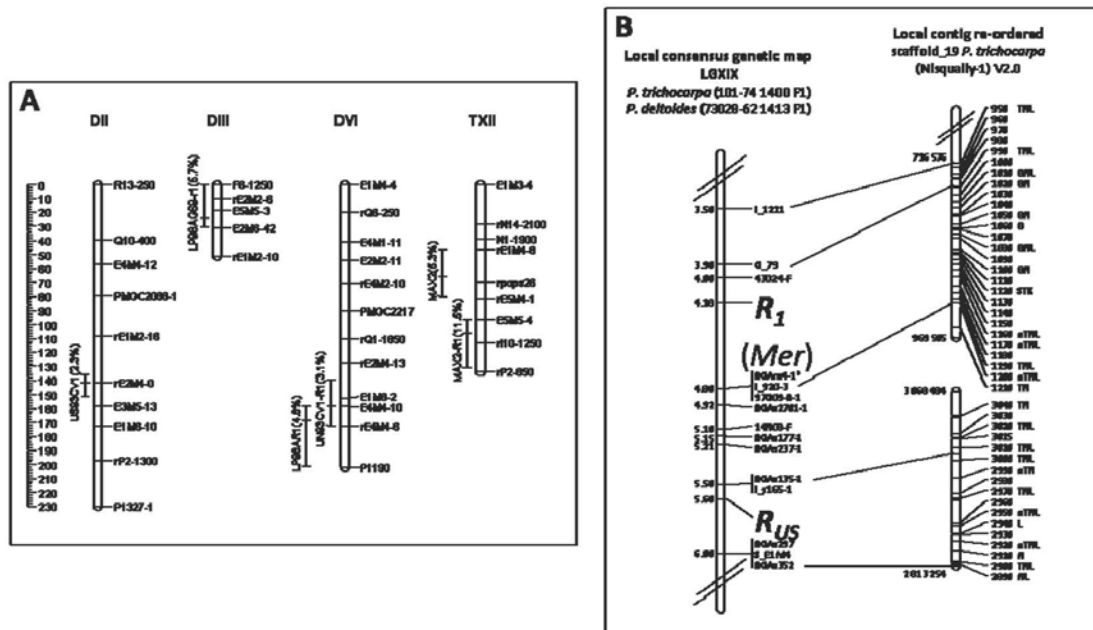


Figure 3 - *Mlp* resistance loci described in the litterature (Cervera *et al.* 1996, Cervera *et al.* 2001, Lescot *et al.* 2004, Jorge *et al.* 2005, Bresson *et al.* 2011,); A: Minor QTLs described in Jorge *et al.* (2005), and detected in *P. deltooides* (D) and *P. trichocarpa* (T) after inoculation in controlled conditions with 7 *Mlp* strains followed by QR assessments (UN: uredinia size; LP: latent period; UN: uredinia number) or after natural rust infection in the field (MAX). Numbers in parenthesis represent the percentage of clonal variance explained by each QTL. See Jorge *et al.* (2005) for further details. B: Localisation of three major resistance factors on a consensus genetic map and alignment on the *P. trichocarpa* genome sequence for chromosome 19 (v2.0). Genetic distances in cM are indicated on the left of the linkage groups. The gene models are designated by their number without the prefix POPTR_0019s. Resistance gene analogs domains are abbreviated as follows: B for BEAF and DREF DNA-binding finger (BED), L for leucine-rich repeat (LRR), n for nuclear localization sequence (NLS), N for nucleotide-binding site (NBS) and T for Toll interleukin 1 receptor (TIR). STK stands for serine threonine kinase. Position of the *Mer* locus (Cervera *et al.* 2001) is deduced from marker RGAmt-1 designed from a *P. deltooides* BAC sequence developed for positional cloning of *Mer* (Lescot *et al.* 2004). For marker details, see Bresson *et al.* (2011).

Although R_{US} maps to a clearly distinct area, all three loci map on the same chromosome (XIX, fig. 3b) which happens to be particularly rich in NBS-LRR resistance gene analogs (Kohler *et al.* 2008).

A combined transcriptomic and proteomic approach has been carried out in two contrasted groups of poplar half-sib genotypes possessing the resistant R_{US} allele (*i.e.* heterozygous $R_{US}r_{US}$ genotypes) or deprived from it (*i.e.* $r_{US}r_{US}$ genotypes) to determine molecular markers associated to the R_{US} -mediated QR. Interestingly, whereas almost no genes were induced at 2 and 4 days after inoculation in the $r_{US}r_{US}$ bulk compared to mock-inoculated leaves, the $R_{US}r_{US}$ bulk was characterized by a strong induction of many marker genes typically associated to qualitative resistance (Rinaldi *et al.* 2007), suggesting a delay in defense reaction activation for QR. Several of these “marker” genes were confirmed by proteomic and by RTqPCR expression profiling (*e.g.* thaumatin-like protein, glutathione *S*-transferase).

Regarding the genetics of the pathogen’s side of the interaction, not much is known yet, even on the genetic determinism of virulence (*i.e.* the pathogen’s matching piece to qualitative resistance). One reason is that progenies are difficult to obtain due to the heteroecious life cycle of the pathogen (*i.e.* the need to perform its sexual stage on a different host plant, here larch) and to its strict biotrophic status. However, recent sequencing of the *Mlp* genome opens the way for new genomics tools and makes the poplar-rust

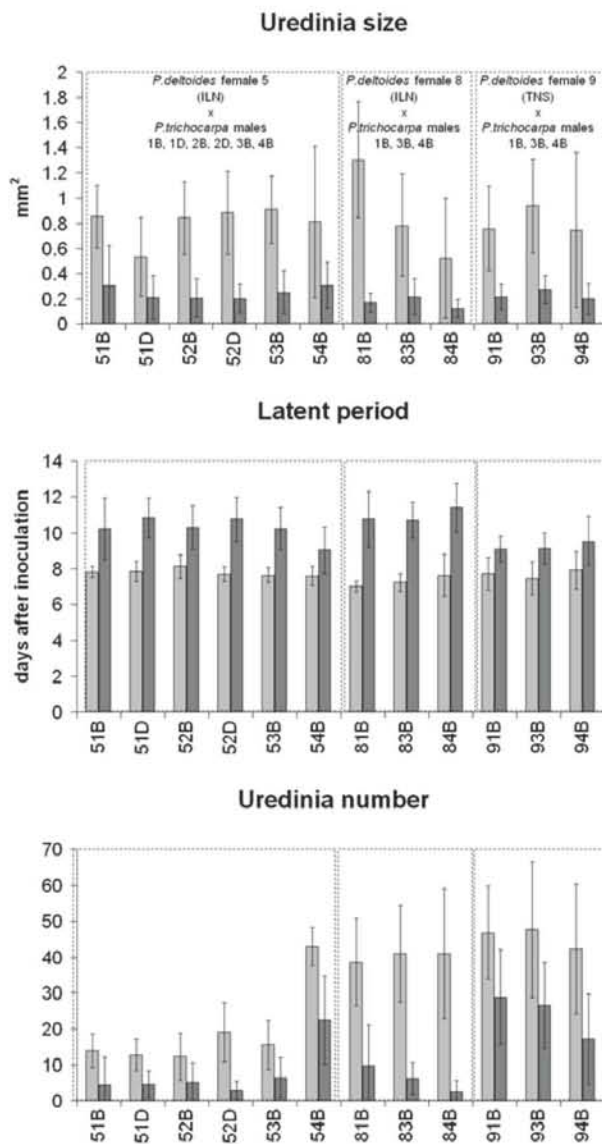


Figure 4 - Family means (\pm associated standard errors) for three epidemiological components in 12 *P. deltooides* \times *P. trichocarpa* F₁ families involving three distinct *P. deltooides* mothers of different origins (ILN, TNS) after leaf-disk inoculation with an *Mlp* strain able to sporulate in presence of any complete resistance factor inherited from *P. deltooides* segregating in this material. For each family, a distinction is made between genotypes carrying such qualitative resistance factor (in black) and genotypes deprived from it (in grey). Presence of segregating qualitative resistance factors was revealed using incompatible stains of the pathogen. See Dowkiw and Bastien (2007) for further details.

interaction a model pathosystem for forest pathology (Duplessis *et al.* 2011a). Most pathogenicity effectors described so far in fungal biotrophic pathogen encode small cysteine-rich secreted proteins (SSP) (Stergiopoulos and de Wit 2009). The *Mlp* genome contains a total of 1,184 SSP-encoding genes, which are mostly specific to this rust fungus (*i.e.* no homologs are found in other fungi, including the wheat stem rust ; Duplessis *et al.* 2011b). More than 50% of these SSP genes are expressed during the successful colonization of poplar leaves representing candidate pathogenicity factors (Duplessis *et al.* 2011b, Hacquard *et al.* in press)

Thinking at larger scales

One of the reasons for the rapid spread of newly adapted strains of *Mlp* lies within the spatial and temporal organisation of host diversity over the country. Poplar is a perennial host that is essentially cultivated as monoclonal stands, and less than ten cultivars are being significantly used by growers. In this context, we investigated to what extent the population genetic structure of *Mlp* can be impacted by the deployment of resistant poplar cultivars over the country.

Since 1982, the interamerican hybrid poplar cv. 'Beaupré' carrying the rust resistance gene *Mer* was broadly planted in France and remained immune for 12 years, but once overcome by virulence 7 of the pathogen, severe rust outbreaks occurred (Xhaard *et al.* 2011). Using both phenotypic (*i.e.* virulence profiles) and genotypic (*i.e.* microsatellites) markers, we showed that *Mlp* isolates carrying virulence 7 were widely distributed all across France and displayed a specific genetic signature consistent with an history of selection and drastic demographic changes resulting from the resistance breakdown (Xhaard *et al.* 2011, fig. 5). This study illustrates how poplar cultivation has influenced the spatial and genetic structure of the pathogen, and has led to the spread of virulence alleles in most pathogen populations. As a consequence, resistance management should certainly be thought about at a continental scale in order to maximize its sustainability (McDonald and Linde 2002).

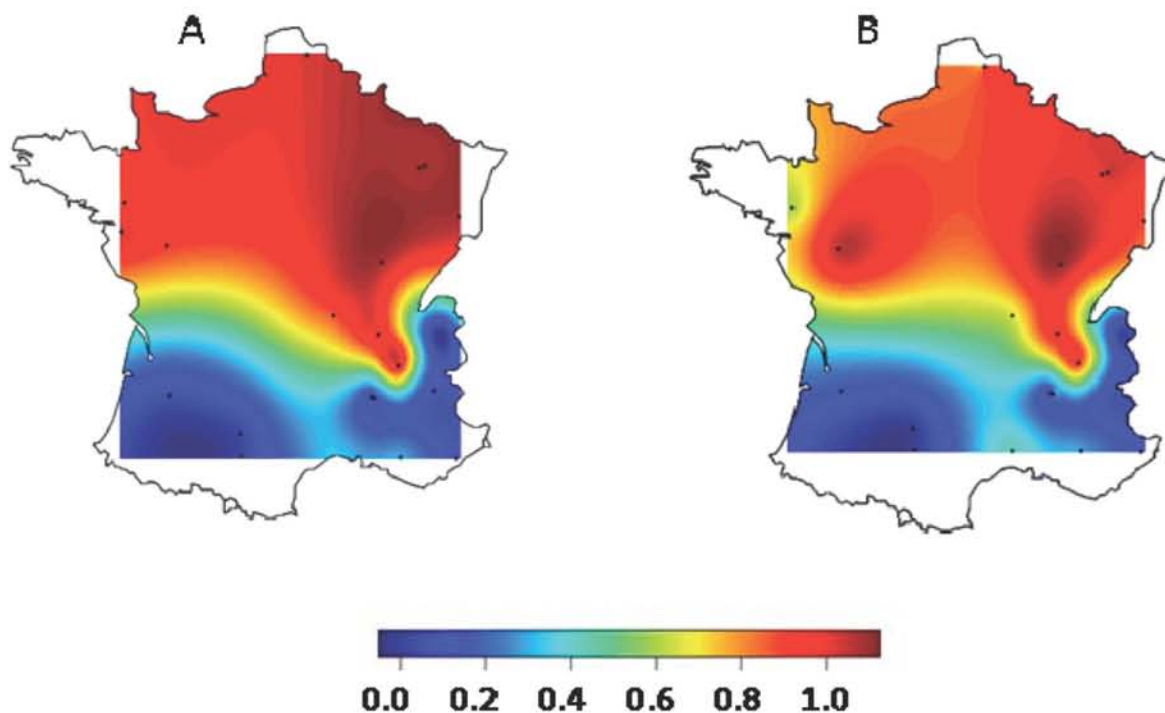


Figure 5 – Spatial interpolations for the frequency of *Mlp* strains A: belonging to the "cultivated" genetic group (*i.e.* "group 1" in Xhaard *et al.* 2011), and B: possessing virulence 7.

Alternative breeding strategies

Urged by growers to deliver new cultivars, breeders explore multiple (possibly combinable) very pragmatic strategies to delay pathogen adaptation.

Pure *P. deltooides* genotypes, although defeated, always show much lower field susceptibility to the pathogen in our nursery in Orléans than their interspecific hybrid progenies. This may result from favourable gene associations that happen to be broken in these hybrids. Constitutive resistance traits related to leaf anatomical characteristics may be particularly affected by hybridization with *P. trichocarpa* and *P. nigra*. As a short-term solution, pure *P. deltooides* cultivars selected for productivity in northern climatic conditions under traditional cultivation practices will be released in 2013. They all carry defeated qualitative resistances but repeatedly showed high QR levels under natural rust infections. Backcrossing interamerican F₁ hybrids to the *P. deltooides* species is also being considered.

Medium term solutions will rely on a more careful exploration of the genetic variability available in the European species *P. nigra* that co-evolved with the pathogen and on the simultaneous release of several unrelated cultivars to generate host diversity at regional scale. A collection of 2,300 *P. nigra* genotypes, most of them originating from different French natural populations but also from Italy, Germany and the Netherlands, have recently been screened for rust resistance under natural and controlled infection. Additional breeding traits like avoidance and tolerance (*i.e.* the ability to maintain growth despite being susceptible to the disease) are also being evaluated using fungicide treated *vs.* untreated field experiments.

Acknowledgements

The research on genetic variation for rust resistance in the *Populus* host species received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/ 2007-2013) under the grant agreement n° 211868 (Noveltree Project), from INRA under the ECOGER Program (AIP 00295-298, INTERPOGGER Project) and from the French Ministry of Agriculture under grant agreements GIS n° E05/08 and E05/09. The research on population genetics of *Mlp* was supported by INRA under the ECOGER Program (AIP 00295-298, INTERPOGGER Project), the Agence Nationale de la Recherche (ANR 07/BDIV-003, EMERFUNDIS Project) and INRA (projet innovant EFPA). S.D. was supported by junior scientist grants from INRA and Région Lorraine. Physical mapping of the resistance factors was supported by INRA and the French Bureau des Ressources Génétiques (BRG). C.X. and A.B. were supported by PhD fellowships from the French Ministry of Education and Research (MESR). B.P. and C.G. were supported by joint PhD fellowships from INRA and Région Lorraine. We would like to thank Axelle Andrieux, Béranger Bertin, Christine Géhin, I. Le Clainche and the INRA Orléans Experimental Unit GBFOR for their technical help.

Literature cited

- Barres, B., Halkett, F., Dutech, C., Andrieux, A., Pinon, J. and Frey, P. 2008.** Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection Genetics and Evolution* 8(5): 577-587.
- Bresson, A., Jorge, V., Dowkiw, A., Guerin, V., Bourgait, I., Tuskan, G. A., Schmutz, J., Chalhoub, B., Bastien, C. and Rampant, P. F. 2011.** Qualitative and quantitative resistances to leaf rust finely mapped within two nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR)-rich genomic regions of chromosome 19 in poplar. *New Phytologist* 192(1): 151-163.
- Cervera, M. T., Gusmao, J., Steenackers, M., Peleman, J., Storme, V., Vanden Broeck, A., Van Montagu, M. and Boerjan, W. 1996.** Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 733-737.
- Cervera, M. T., Storme, V., Ivens, B., Gusmão, J., Liu, B. H., Hostyn, V., Van Slycken, J., Van Montagu, M. and Boerjan, W. 2001.** Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 158: 787-809.
- Dowkiw, A. and Bastien, C. 2004.** Characterization of two major genetic factors controlling quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: strain specificity, field expression, combined effects, and relationship with a defeated qualitative resistance gene. *Phytopathology* 94(12): 1358-1367.
- Dowkiw, A. and Bastien, C. 2007.** Presence of defeated qualitative resistance genes frequently has major impact on quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in *P. xinteramericana* hybrid poplars. *Tree Genetics and Genomes* 3(3): 261-274.

- Dowkiw, A., Husson, C., Frey, P., Pinon, J. and Bastien, C. 2003.** Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: Genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology* 93(4): 421-427.
- Dowkiw, A., Voisin, E. and Bastien, C. 2010.** Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathology* 59: 523-534.
- Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y. C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B. L., Chiu, R., Coutinho, P. M., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M. G., Kodira, C. D., Kohler, A., Kues, U., Lindquist, E. A., Lucas, S. M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J. L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A. A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G. A., Henrissat, B., Van de Peer, Y., Rouze, P., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Schein, J. E., Zhong, S. B., Hamelin, R. C., Grigoriev, I. V., Szabo, L. J. and Martin, F. 2011a.** Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(22): 9166-9171.
- Duplessis, S., Hacquard, S., Delaruelle, C., Tisserant, E., Frey, P., Martin, F. and Kohler, A. 2011b.** *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 24: 808-818.
- Eenink, A. H. 1976.** Genetics of host-parasite relationships and uniform and differential resistance. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 82: 133-145.
- Hacquard, S., Joly, D. L., Lin, Y.-C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R. C. and Duplessis, S. in press.** A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Jorge, V., Dowkiw, A., Faivre-Rampant, P. and Bastien, C. 2005.** Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist* 167(1): 113-127.
- Kohler, A., Rinaldi, C., Duplessis, S., Baucher, M., Geelen, D., Duchaussoy, F., Meyers, B. C., Boerjan, W. and Martin, F. 2008.** Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology* 66: 619-636.
- Lefèvre, F., Goué-Mourier, M. C., Faivre-Rampant, P. and Villar, M. 1998.** A single gene cluster controls incompatibility and partial resistance to various *Melampsora larici-populina* races in hybrid poplars. *Phytopathology* 88(2): 156-163.
- Lefèvre, F., Pichot, C. and Pinon, J. 1994.** Intra- and interspecific inheritance of some components of the resistance to leaf rust (*Melampsora larici-populina* Kleb.) in poplars. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 501-507.

- Lescot, M., Rombauts, S., Zhang, J., Aubourg, S., Mathe, C., Jansson, S., Rouze, P. and Boerjan, W. 2004.** Annotation of a 95-kb *Populus deltoides* genomic sequence reveals a disease resistance gene cluster and novel class I and class II transposable elements. *Theoretical and Applied Genetics* 109(1): 10-22.
- McDonald, B. A. and Linde, C. 2002.** Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.
- Pichot, C. and Teissier du Cros, E. 1993.** Susceptibility of *P.deltoides* Bartr. to *Melampsora larici-populina* and *M.allii-populina*. *Silvae Genetica* 42: 4-5.
- Pinon, J. 1992.** Variability in the genus *Populus* in sensitivity to *Melampsora* rusts. *Silvae Genetica* 41(1): 25-34.
- Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., Wincker, P., Le Thiec, D., Fluch, S., Martin, F. and Duplessis, S. 2007.** Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology* 144: 347-366.
- Stergiopoulos, I. and de Wit, P. 2009.** Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology* 47: 233-263.
- Xhaard, C., Fabre, B., Andrieux, A., Gladieux, P., Barrès, B., Frey, P. and Halkett, F. 2011.** The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* 20: 2739-2755.

Annexe 3

Bilan d'activité (communication, formation, ...) de la thèse

COMMUNICATIONS***Communications orales effectuées (incluant les séminaires internes à l'UMR IAM)***

- 2012, 19 juin – Norwich, Royaume-Uni – Cours EMBO ‘Plant-Microbe Interactions’
Characterisation of P4-1, a poplar leaf rust candidate effector
- 2012, 11 mai – Norwich, Royaume-Uni – Séminaire du Sainsbury Laboratory
The poplar, the poplar rust and their (candidate) effectors
- 2012, 28 mars – Umeå, Suède – 4th UPSC-INRA (UPRA) meeting
Poplar immunity at stake: new insights into the search for rust effectors and their targets
- 2012, 05 mars – Nancy, France – Séminaire de l'UMR IAM
*Effectors of the biotroph poplar leaf rust fungus *Melampsora larici-populina**
- 2012, 17 janvier – Aussois, France – Congrès de la société française de phytopathologie
*Analyse fonctionnelle d'effecteurs du champignon biotrophe *Melampsora larici-populina**
- 2011, 05 décembre – Québec, Canada – Séminaire au CFL
RISP, a novel antifungal peptide involved in poplar defense against poplar rust
- 2011, 21 juin – Nancy, France – Journée des Doc/Post-Doc de l'UMR IAM
RISP, a novel antifungal peptide involved in poplar defense against poplar rust
- 2011, 14 janvier – Nancy, France – Séminaire de l'UMR IAM
*The biotrophic *Populus/Melampsora* interaction*
- 2011, 11 janvier – Lyon, France – Séminaire du département EFPA de l'INRA
*Post-genomic analysis of the biotrophic *Populus/Melampsora* interaction*
- 2010, 06 octobre – Montpellier, France – Comité de thèse
*Post-genomic analysis of the biotrophic *Populus/Melampsora* interaction*
- 2010, 25 juin – Nancy, France – Séminaire de l'UMR IAM
*Post-genomic analysis of the biotrophic *Populus/Melampsora* interaction*
- 2010, 14 juin – Nancy, France – Journée des Doc/Post-Doc de l'UMR IAM
Genome-Wide Analysis of Thaumatin-Like Proteins (TLPs) with emphasis on poplar

Présentations de Poster

- 2012, 17 septembre – Fallen Leaf, USA – 30th New Phytologist Symposium
Poplar immunity at stake: new insights into the search for rust effectors and their targets
- 2012, 20 juin – Norwich, Royaume-Uni – Cours EMBO ‘Plant-Microbe Interactions’
Poplar immunity at stake: new insights into the search for rust effectors and their targets
- 2011, 20 janvier – Nancy, France – Séminaire de l'école doctorale RP2E
*Genome-wide analysis of thaumatin-like proteins and annotation in *Populus trichocarpa**
- 2010, 27 janvier – Aussois, France – Congrès de la société française de phytopathologie
*Genome-wide analysis of thaumatin-like proteins and annotation in *Populus trichocarpa**

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture*(les premiers auteurs sont soulignés)*

- 2012, 30 août – PLoS ONE – article de recherche
RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers PtSultr3;5, a fungal-induced host sulfate transporter
Benjamin Petre, Emmanuelle Morin, Emilie Tisserant, Stéphane Hacquard, Corinne Da Silva, Julie Poulain, Christine Delaruelle, Francis Martin, Nicolas Rouhier, Annegret Kohler, Sébastien Duplessis
- 2012, mars – MPMI – article de recherche

A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identified Candidate Effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust)

Stéphane Hacquard, David L. Joly, Yao-Cheng Lin, Emilie Tisserant, Nicolas Feau, Christine Delaruelle, Valérie Legué, Annegret Kohler, Philippe Tanguay, Benjamin Petre, Pascal Frey, Yves Van de Peer, Pierre Rouzé, Francis Martin, Richard C. Hamelin, Sébastien Duplessis

- 2011, 28 juin – Journal of Pathogens - article de revue

The Poplar-Poplar Rust Interaction: Insights from Genomics and Transcriptomics

Stéphane Hacquard, Benjamin Petre, Pascal Frey, Arnaud Hecker, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

- 2011, 15 février – BMC Plant Biology – article de recherche

Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar

Benjamin Petre, Ian Major, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

Autres articles publiés

- 2011, 20 janvier – Actes du séminaire de l'école doctorale RP2E – article de revue
Les apports de la génomique pour l'étude des familles multigéniques : exemple des thaumatin-like proteins (TLPs) chez le peuplier

Benjamin Petre, Ian Major, Pascal Frey, Francis Martin, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

Articles en préparation pour soumission à des journaux internationaux à comité de lecture

- En préparation, soumission prévue à New Phytologist – article de recherche
Genome-wide analysis of RLP and physically-associated genes in poplar unravel a novel endogenous peptide elicitor

Benjamin Petre, Hugo Germain, Arnaud Hecker, Armand Séguin, Sébastien Duplessis, Nicolas Rouhier

- En préparation, soumission prévue à Plant Physiology – article de recherche
A poplar cationic small-secreted protein elicits plant defense responses and also directly inhibits pathogen growth

Benjamin Petre, Arnaud Hecker, Hugo Germain, Meriem Benchabane, Pascale Tsan, Armand Séguin, Sébastien Duplessis, Nicolas Rouhier

- En préparation – article de recherche

Poplar leaf rust candidate effectors: virulence activities, structural characterization and plant targets

Benjamin Petre, Hugo Germain, Arnaud Hecker, Pascale Tsan, Calypso Dard, Gunnar Wingsle, Armand Séguin, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis

- En préparation – acte de congrès

Breeding poplars with durable resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust: a multidisciplinary approach to understand and delay pathogen adaptation

A Dowkiw, V Jorge, M Villar, E Voisin, V Guérin, P Faivre-Rampant, A Bresson, F Bitton, S Duplessis, P Frey, B Petre, C Guinet, C Xhaard, B Fabre, F Halkett, C Plomion, C Lalanne, C Bastien

FORMATION SCIENTIFIQUE

Participation à des congrès scientifiques

- 2012, 24-26 octobre (à venir) – Montpellier, France – Effectome meeting V
- 2012, 16-19 septembre – Fallen Leaf, USA – 30th New Phytologist Symposium
- 2012, 26-28 mars – Umeå, Suède – 4th UPRA meeting
- 2012, 16-20 janvier – Aussois, France – 9^{ème} rencontres de phytopathologie, JJC 2012
- 2010, 06-08 octobre – Montpellier, France – Effectome meeting III
- 2010, 25-29 janvier – Aussois, France – 8^{ème} rencontres de phytopathologie, JJC 2010
- 2009, 03-05 novembre – Montpellier, France – Effectome meeting II

Participation à des cours internationaux pour chercheurs

- 2012, 16-29 juin – Norwich, Royaume-Uni – EMBO course ‘Plant-Microbe Interactions’
- 2010, 17-21 mai – Nancy, France – PhD course ‘International Forestry and Global Issues’

Autres formations

- 2011, 21-25 mars – Nancy, France – Cours RP2E ‘valorisations agricoles’
- 2011, 10-12 janvier – Lyon, France – Séminaire du département EFPA de l’INRA
- 2010, 17-19 février – Nancy, France – Formation continue INRA au logiciel R
- 2009, automne-hiver (~20h) – Nancy, France – Cours RP2E ‘énergies renouvelables’

Séjours dans un laboratoire étranger

- 2011, 13 juillet-06 août – Québec, Canada – séjour au centre de foresterie des Laurentides, laboratoire d’Armand Séguin
- 2011, 15 novembre-15 décembre – Québec, Canada – séjour au centre de foresterie des Laurentides, laboratoire d’Armand Séguin

ENSEIGNEMENTS ET ENCADREMENT D’ETUDIANTS

Vacations (physiology végétale)

- Année universitaire 2010/2011 – Université de Lorraine – 62 heures de travaux pratiques
- Année universitaire 2009/2010 – Université de Lorraine – 38 heures de travaux pratiques

Autres enseignements

- 2011, 23 novembre – Université Laval, conférencier invité – 1 heure de cours

Encadrement d’étudiants

- 2012, avril-juillet – Calypso Dard, stage de Master 1 FAGE, Université de Lorraine.

AUTRES

- 2010, 14 juin – organisateur de la ‘journée des Doc/Post-Doc’ de l’UMR IAM (journée de présentations des travaux de recherche)

