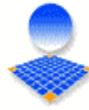


Université Montpellier II
Sciences de la vie
ED 167 Biologie des systèmes intégrés, Agronomie, Environnement (BSIAE)



Dossier pour l'obtention du diplôme
d'Habilitation à Diriger des Recherches

présenté par :

Diana FERNANDEZ

UMR DGPC 1097

Equipe Résistance des Plantes aux Parasites
IRD - Institut de Recherche pour le Développement



Présentée et soutenu publiquement le 4 Décembre 2006

devant le jury composé de:

M. B. TOURAINE, Professeur, Université Montpellier II	Président
Mme M.-T. ESQUERRÉ-TUGAYÉ, Professeur, Université Toulouse,	Rapporteur
M. M.-H. LEBRUN, Directeur de Recherches, CNRS, Lyon	Rapporteur
M. Y. MARCO, Directeur de Recherches, CNRS, Toulouse	Rapporteur
M. A. CHARRIER, Professeur, ENSAM, Montpellier	Examineur

Remerciements

J'adresse mes plus vifs remerciements aux membres du jury : à Mme Marie-Thérèse Esquerré-Tugayé, M. Marc-Henri Lebrun et M. Yves Marco, qui ont accepté la charge d'être rapporteurs, ainsi qu'à Messieurs les Professeurs André Charrier et Bruno Touraine pour leur participation. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Jean-Paul Geiger, ancien directeur du laboratoire de Phytopathologie de l'IRD, mon « coach », pour avoir su mettre la pression quand il le fallait, ainsi qu'à Michel Nicole, pour le soutien permanent et la confiance qu'ils m'ont accordée dans la réalisation de mes travaux de recherches. Un grand merci aussi à Patrick Saïndrenan pour ses conseils utiles dans la rédaction du projet. Merci également à mes chères collaboratrices Anne-Sophie Petitot et Anne-Claire Lecouls avec lesquelles je partage les joies et les affres de la recherche sur le caféier. Enfin, je n'oublierai pas de remercier tous mes collègues et stagiaires passés et actuels pour leur collaboration, aide et bonne humeur !

SOMMAIRE

CURRICULUM VITAE.....	1
LISTE DES PUBLICATIONS.....	4
1. Articles.....	6
1.1. Articles parus dans des revues scientifiques indexées à l'ISI.....	6
1.2. Articles parus dans des revues scientifiques (à comité de lecture) non indexées à l'ISI.....	7
1.3. Proceedings.....	8
1.4. Revues de vulgarisation.....	9
2. Chapitres d'ouvrages.....	9
3. Communications orales à des congrès.....	10
4. Mémoires de diplôme.....	11
5. Entretiens avec la presse.....	12
ACTIVITÉS D'ENCADREMENT, D'ENSEIGNEMENT ET D'ANIMATION DE LA RECHERCHE.....	13
1. Encadrement d'étudiants ou de chercheurs.....	15
2. Participation à l'enseignement.....	17
3. Evaluation scientifique.....	17
4. Expertises.....	18
5. Responsabilités administratives.....	18
6. Animation scientifique.....	18
7. Financements de recherche.....	18
TRAVAUX DE RECHERCHE.....	20
1. Thématique générale et objectifs des recherches.....	21
2. Diversité et structure génétique des populations de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
2.1. Avant propos.....	23
2.2. Contexte scientifique.....	24
2.3. Objectifs.....	26
2.4. Modèles d'étude.....	26
2.5. La Fusariose du cotonnier.....	27
2.6. Le Bayoud du palmier dattier.....	29
2.7. La Fusariose du Palmier des Canaries.....	31
2.8. Conclusions.....	32
2.8.1. Amélioration des connaissances.....	32
2.8.2. Applications pratiques.....	33

3. Mécanismes génétiques et moléculaires de la résistance du caféier (<i>Coffea arabica</i>) aux agents pathogènes.	34
3.1. Contexte des recherches	34
3.2. Objectifs.....	36
3.3. Modèle biologique : le caféier (<i>Coffea arabica</i> L.) et son amélioration pour la résistance	36
3.4. Résultats acquis	40
3.4.1. Identification de gènes de caféier induits lors de la résistance à <i>H. vastatrix</i> ...	40
3.4.2. Cinétique/dynamique des interactions caféier / <i>H. vastatrix</i>	41
3.4.3. Caractérisation du gène <i>CaWRKY1</i>	41
3.5. Conclusions et perspectives	43
PROJET DE RECHERCHES :	
Physiologie moléculaire de la résistance du caféier aux parasites.....	46
1. Introduction.....	47
2. Description des activités	48
2.1. Identification de gènes impliqués dans la résistance spécifique du caféier aux parasites.....	48
2.1.1. Recherche de gènes candidats.....	48
2.1.2. Etude de la régulation de l'expression des gènes	49
2.2. Caractérisation fonctionnelle des gènes.....	50
2.2.1. Rôle de <i>CaWRKY1</i> dans la résistance	50
2.2.2. Autres gènes d'intérêt	55
2.3. Développement d'un modèle d'étude de la résistance rouille / <i>A. thaliana</i>	56
3. Conclusion.....	57
4. Critères de faisabilité	57
4.1. Collaborations.....	57
4.2. Outils	58
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	59
ANNEXES.....	68

CURRICULUM VITAE

Etat civil

Diana FERNANDEZ
née le 24 Décembre 1961 à Colmar (68)
nationalité Française
un enfant (8 ans)

Adresse professionnelle

Institut de Recherches pour le
Développement (IRD)
911, avenue Agropolis
BP64501,
34394 Montpellier cedex 5
mél : Diana.Fernandez@mpl.ird.fr
tel : 04 67 41 62 87
fax : 04 67 41 62 83

Situation professionnelle

Chargée de Recherche de 1ère classe à l'IRD
UMR 1097 IRD/INRA/CIRAD - Diversité et Génome des Plantes Cultivées
Equipe "Résistance des Plantes aux Parasites"

Titres universitaires

- 1987 Doctorat de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Spécialité, Biologie des Organismes et des Populations.
- 1984 Diplôme d'Etudes Approfondies de Sciences Agronomiques, USTL, Montpellier.
- 1983 Maîtrise de Biochimie, USTL, Montpellier.
- 1982 Licence de Biochimie, USTL, Montpellier.
- 1981 DEUG B option Biologie, USTL, Montpellier.

Carrière et mobilité thématique

- 1984-1987 Allocataire de recherche du Ministère de la Recherche et des Technologies. Préparation du Doctorat (Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines - INRA , Montpellier)
Thématique : Dynamique et régulation de l'interaction Bradyrhizobium japonicum/soja
- 1988 Allocataire de recherche du Programme Mercure de coopération scientifique franco -espagnol. Stage post-doctoral 12 mois. (Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Biologie, Séville, Espagne).
Thématique : Caractérisation moléculaire de Rhizobium
- 1990 Recrutement (Chargée de Recherche de 2ème classe) à l'IRD
Affectation : laboratoire de Phytopathologie Tropicale du Centre IRD de Montpellier

1995 Promotion à la 1ère classe de Chargé de Recherche

Thématique 1990 - 1999 : Diversité et structure génétique des populations de champignons phytopathogènes

Thématique depuis 2000 : Physiologie moléculaire de la résistance spécifique du caféier (Coffea arabica) aux parasites.

LISTE DES PUBLICATIONS

Tableau 1. Publimétrie D. Fernandez

Revue	Facteur d'impact 2004	Nombre	Année de publication	Place
Nature	32	1	1998	dernier auteur
App. Environ. Microbiol.	3,8	2	1994, 1998	1 ^{er} auteur
New Phytol.	3,3	1	2001	milieu
Mol. Plant Pathol.	2,8	1	2004	dernier auteur
Phytopathology	2,2	5	1994,96,97,98,99	2ème, dernier, dernier, milieu, 3ème
Heredity	2	1	2001	milieu
Physiol.Mol. Plant Pathol.	1,6	1	2003	milieu
Eur. J. Plant Pathol.	1,5	1	1997	1 ^{er} auteur
Plant and Soil	1,5	1	1987	1 ^{er} auteur
Plant Sci.	1,4	1	2006	dernier auteur
Mycol. Res.	1,3	1	1996	dernier auteur
Plant Pathol.	1,2	1	2000	3ème
Symbiosis	0,8	2	1988, 1989	1 ^{er} auteur
In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant	0,4	1	2002	milieu
African J. Biotechnol.	-	1	2005	milieu
Phytopathol. Medit.	-	3	1993,94,2005	dernier auteur

1. Articles

Le tableau 1 présente la liste des revues scientifiques où nous avons présenté les résultats de nos travaux de recherche.

1.1. Articles parus dans des revues scientifiques indexées à l'ISI.

Les facteurs d'impacts (IF) 2004 sont indiqués entre parenthèses.

1. Fernandez D. and Cleyet-Marel J.C., 1987a. The influence of the culture medium on the competitive abilities of *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Plant and Soil (IF 1,5)**, 103,126-128.
2. Fernandez D. and Cleyet-Marel J.C., 1988. Competition between *Bradyrhizobium japonicum* strains for nodulation : characterisation of nodulation patterns using plastic growth-pouches. **Symbiosis (IF 0,8)**, 6, 281-294.
3. Fernandez D. and Cleyet-Marel J.C., 1989. Competition between *Bradyrhizobium japonicum* strains for nodulation : study on regulation of nodulation of soybean. **Symbiosis (IF 0,8)**, 7, 171-186.
4. Assigbétse K.B, Fernandez D., Dubois M.P and Geiger J-P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology (IF 2,2)**, 84: 622-626.
5. Fernandez D., Assigbétse K.B., Dubois M.P and Geiger J-P. 1994. Molecular characterization of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Applied Environmental Microbiology (IF 3,8)**, 60:4039-4046.
6. Guillemaud T., Raymond M., Callot G., Cleyet-Marel J.C. and Fernandez. D. 1996. Variability of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA of a truffle species (*Tuber aestivum*). **Mycological Research (IF 1,3)**, 100, 547-550.
7. Tantaoui A., Ouinten M., Geiger J.P. and Fernandez. D. 1996. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing Bayoud disease of date palm in Morocco. **Phytopathology (IF 2,2)**, 86, 787-792.
8. Fernandez D., Ouinten M., Tantaoui A. and Geiger. J-P. 1997. Molecular records of micro-evolution within the Algerian population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* during its spread to new oases. **European Journal of Plant Pathology (IF 1,5)**, 103, 485-490.
9. Fernandez D., Ouinten M., Tantaoui A., Geiger J-P., Daboussi M-J and T. Langin. 1998. *Fot1* insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide useful PCR targets for detection of the date palm pathogen. **Applied Environmental Microbiology (IF 3,8)**, 64, 633-636.
10. Kistler H. C., C. Alabouvette, R. P. Baayen, S. Bentley, D. Brayford, A. Coddington, J. Correll, M.-J. Daboussi, K. Elias, D. Fernandez, T. R. Gordon, T. Katan, H. G. Kim, J. F. Leslie, R. D. Martyn, Q. Migheli, N. Y. Moore, K. O'Donnell, R. C. Ploetz, M. A. Rutherford, B. Summerell, C. Waalwijk, and S. Woo. 1998. Systematic Numbering of Vegetative Compatibility Groups in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology (IF 2,2)**, 88, 30-32.

11. Bertault G., Raymond M., Berthomieu A., Callot G. and Fernandez D. 1998. Trifling variation in truffles. **Nature (IF 32)**, 394, 734-734.
12. Plyler T., Simone G.W., Fernandez D. and H.C. Kistler. 1999. Rapid detection of the *F. oxysporum* lineage containing the Canary Island date palm wilt pathogen. **Phytopathology (IF 2,2)**, 89, 407-413.
13. Plyler T., Simone G.W., Fernandez D. and H.C. Kistler. 2000. Genetic diversity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. **Plant Pathology (IF 1,5)**, 49, 155-164.
14. Duhoux E., Rinaudo G., Diem H.G., Auguy F., Fernandez D., Bogusz D., Franche C., Dommergues Y. and B. Huguenin. 2001. An angiosperm tree, *Gymnostoma* sp. (*Casuarinaceae*) produces ectotrophic nodules colonized by arbuscular mycorrhizal fungi related to *Glomus*. **New Phytologist (IF 3,3)**, 149: 115-125.
15. Bertault G., Rousset F., Fernandez D., Berthomieu A., Callot G. and Raymond M. Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. 2001. **Heredity (IF 2,0)**, 86, 451-458.
16. Etienne H., Anthony F., Dussert S., Fernandez D., Lashermes P. and Bertrand B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant (IF 0,4)**, 38, 129 – 138.
17. Chen Z. J., Ribeiro A., Silva M.C., Santos P., Guerra-Guimarães L., Gouveia M., Fernandez D. and Rodrigues C.J. Jr. 2003. Heat shock-induced susceptibility of green coffee leaves and berries to *Colletotrichum gloeosporioides* and its association to *PR*- and *hsp70* gene expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology (IF 1,6)**, 63, 181-190.
18. Fernandez D., Santos P., Agostini C., Bon M.-C., Petitot A.-S., Silva M. C., Guerra-Guimarães L., Ribeiro A., Argout X. and Nicole M. 2004. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology (IF 2,8)**, 5, 527-536.
19. Ganesh D., Petitot A.-S., Silva M., Alary R., Lecouls A.C. and Fernandez D. 2006. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science (IF 1,4)**, 170:1045-1051.

1.2. Articles parus dans des revues scientifiques (à comité de lecture) non indexées à l'ISI.

20. Fernandez D. et Cleyet-Marel J.C., 1987. Identification par test E.L.I.S.A. de souches de *Bradyrhizobium japonicum* en culture et dans des nodosités de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). **Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture Française**, 73,163-171.
21. Tantaoui A. et. Fernandez D., 1993. Comparaison entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* des sols de palmeraies par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). **Phytopathologia Mediterranea**, 32: 235-244.

22. Fernandez D. and Tantaoui A. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis : a tool for rapid characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolates? **Phytopathologia Mediterranea**, 33: 223-229.
23. Bellahcene M., Fortas Z., Fernandez D. and Nicole M. 2005. Vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* isolated from olive trees (*Olea europea* L.) in Algeria. **African Journal of Biotechnology**, 4, 963-967.
24. Bellahcene M., Assigbétse K., Fortas Z., Geiger J.P., Nicole M. and Fernandez D. 2005. Genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from olive trees in Algeria. **Phytopathologia Mediterranea**, 44, 266-274.
25. Silva M.C., Várzea V., Guerra-Guimarães L., Azinheira H.G., Fernandez D., Petitot A.-S., Bertrand B., Lashermes P., Nicole M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease (CBD). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18:119-147.

1.3. Proceedings

26. Fernandez D., Ouinten M., Tantaoui A., Lourd M. and Geiger J.P. 1995. Population genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. **Fungal Genetic Newsletter**, 42A:34 (Abstract).
27. T. Plyler, H.C. Kistler and Fernandez D. 1997. Development of a PCR detection method for *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*. **Phytopathology (IF 2,2)** 87:S78.(Abstract)
28. Fernandez D., Tantaoui A., Ouinten M., T. Langin, Daboussi M-J and Geiger J-P. 1997. Bayoud of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) : population genetic structure and genetic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. **Proceedings of the 10th congress of the Mediterranean Phytopathological Union**, SFP (eds), Montpellier.
29. Fernandez D., T. Plyler and H.C. Kistler. 1997. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* and *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* are distinct genetic entities as evidenced by molecular markers. **Proceedings of the 10th congress of the Mediterranean Phytopathological Union**, SFP (eds), Montpellier.
30. Fernandez D., Noir S., Bon M-C., Combes M-C., Silva M.C., Guerra-Guimarães L., Anthony F., Bertrand B. and Lashermes P. 2001. Molecular physiology and genetics of coffee resistance to parasites. **Proceedings of the 19th International Conference on Coffee Science**, ASIC, Trieste, Italy, ASIC (eds.), Paris.
31. Ganesh D., Petitot A.-S., Alary R., Santos P., Ribeiro A., Silva M., Guerra-Guimarães L. and Fernandez D. 2004. Characterization of the early response of coffee to *Hemileia vastatrix* using real-time quantitative RT-PCR. **Proceedings of the 20th International Conference on Coffee Science**, ASIC, Bangalore, Inde, ASIC (eds.), Paris.
32. Ramiro, D., Braghini M., Petitot, A.-S., Maluf M. P. and Fernandez D. 2006. Use of the leaf-disc technique for gene expression analysis of the coffee responses to *Hemileia vastatrix* infection. **Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science**, ASIC, Montpellier, soumis.

33. Fernandez D., Ramiro D., Petitot A.-S. and Maluf M. 2006. Phylogenetic analysis of the WRKY transcription factors gene superfamily in coffee plants. **Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science**, ASIC, Montpellier, soumis.
34. Lecouls A.-C., Petitot A.-S. and Fernandez D. 2006. Early expressed genes in the coffee resistance response to root-knot nematodes (*Meloidogyne sp.*) infection. **Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science**, ASIC, Montpellier, soumis.
35. Petitot A.-S., Lecouls A.-C. and Fernandez D. 2006. Phylogenetic origins and expression analysis of a duplicated *WRKY* gene in the polyploid species *Coffea arabica*. **Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science**, ASIC, Montpellier.
36. Barros É.V.S.A., Costa P.M., Gomes A.C.M.M., Falcão R., Ribeiro V.F., Eira M.T.S., Pereira A.A., Nicole M., Fernandez D., De Sá M.F.G., Carneiro R.M.D.G. 2006. Characterization of histological effects of *Meloidogyne incognita* infection in resistant and susceptible *Coffea arabica* genotypes. **Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science**, ASIC, Montpellier, soumis.

1.4. Revues de vulgarisation

37. Fernandez D., Lourd M., Ouinten M., Tantaoui A. et J-P. Geiger. 1995. Le Bayoud du palmier dattier : une menace pour la phoeniciculture ? **Phytoma**, 469: 36-39.
38. Bertault G., Berthomieu A., Callot G., Fernandez D. et M. Raymond. 1998. L'inné et l'acquis chez les truffes noires. **La Recherche**, 315, Décembre 1998, 30-32.

2. Chapitres d'ouvrages

1. Brygoo Y., Caffier V., Carlier J., Fabre J.-V., Fernandez D., Giraud T., Mourichon X., Neema C., Notteghem J.-L., Pope C., Tharreau D. and M.-H. Lebrun. 1998. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In **"Molecular variability of fungal pathogens"**, P. Bridge, Y. Couteaudier and J. Clarkson Eds., Oxon, CAB International, p. 133-148.
2. Nicole M., Daniel J.F., Martinez C., Bresson E., El Bashir O., Lopez F., Assigbétse K., Fernandez D., Montillet J.L. and Geiger J.P. 1998. The hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. In **"Recent Research Developments in Microbiology"**, 2: 641-654
3. Fernandez D. et M. Raymond. 1999. Diversité génétique des populations de truffe. In **"La truffe, la terre, la vie"**, G. Callot coord., Paris, INRA Eds., p.78-84.
4. Fernandez D. and T. Langin. 2002. Transposable elements in fungi : new diagnostic tools. In **"The Mycota, vol XI Application in Agriculture"**, F. Kempken Ed., Springer Verlag, Berlin, p.171-192.
5. Fernandez D. and P. Lashermes. 2002. Molecular tools for improving coffee (*Coffea arabica* L.) resistance to parasites. In **"Molecular techniques in crop improvement"**, S Mohan Jain, DS Brar, BS Ahloowalia Eds, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, , p. 327-345.

6. Lecouls A.C., Petitot A.S., Marmey P., Silva M.C., Guerra-Guimarães L., Fernandez D., Nicole M., 2005. Physiology and defence mechanisms to pathogens in tropical woody plants. In "**Molecular biology of tropical plants**", Research Signpost, India.
7. Fernandez D. and Petitot A.S., 2005. Coffee molecular resistance responses to the leaf rust fungus (*Hemileia vastatrix*). In "**Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**", L. Zambolin, E.M. Zambolin and V.M. Pinto Varzea Eds, Univ. Fed. Viçosa Pub., Brésil, p.285-304.

3. Communications orales à des congrès

Sur invitation

1. Fernandez D., 1992. Application des techniques de biologie moléculaire à l'étude de la diversité génétique des champignons phytopathogènes. Communication orale sur invitation présentée au **séminaire FIS-ORSTOM "Interactions Plantes Microorganismes"**, Dakar, 17-23 Février.
2. Tantaoui A., Fernandez D. and Geiger J.P., 1995. Caractérisation moléculaire et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis.*, responsable du Bayoud chez le Palmier dattier. Communication orale invitée aux **Jornadas internacionales sobre la Palmera datilera en la agricultura de los oasis de los países mediterraneos**, Elche, Espagne, 25-27 Avril.
3. Fernandez D., 2001. Fusariosis of Canariensis Date Palms : genetic diversity and molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. Communication orale sur invitation à la **11nd European biennale Dies Palmarum**, San Remo, Italie, 5-7 Décembre.
4. Fernandez D. and Petitot A.S., 2005. Coffee molecular resistance responses to the leaf rust fungus (*Hemileia vastatrix*). Communication orale sur invitation au **First International Workshop on Durable Resistance of Coffee to Leaf Rust**, Viçosa, Brésil, 26-28 Septembre.

Sur sélection

5. Fernandez D., Tantaoui A. and Geiger J.P., 1993. Caractérisation par la compatibilité végétative, RFLP, et RAPD, d'un groupe unique chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, responsable du bayoud du Palmier dattier. Communication orale au **3ème Congrès de la Société Française de Phytopathologie**, Dijon, 6-10 Décembre.
6. Fernandez D., Ouinten M., Lourd M. and Geiger J.P., 1994. The bayoud of date palm tree in Algeria : genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Communication orale au **Fifth Arab Congress of Plant Protection**, Fes, Maroc, 27 Novembre-2 Décembre.
7. Tantaoui A., Fernandez D. and Geiger J.P., 1994. Characterization and analysis of genetic diversity by vegetative compatibility, RAPD and RFLP in *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* causing bayoud of date palm. Communication orale au **Fifth Arab Congress of Plant Protection**, Fes, Maroc, 27 Novembre-2 Décembre.
8. Fernandez D., Tantaoui A., Ouinten M., T. Langin, Daboussi M-J and Geiger J-P. 1997. Bayoud of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) : population genetic structure and genetic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis.*. Communication

orale au **10th congress of the Mediterranean Phytopathological Union**, 1-5 Juin, Montpellier.

9. D. Fernandez, Bertault G., Berthomieu A., Guillemaud T., Raymond M., et Callot G. 1997. Approche génétique de la structuration des populations de la truffe noire *Tuber melanosporum*. Communication orale aux "**Journées Jean Chevaugéon - Rencontres de Mycologie - Phytopathologie**", Aussois, 5-9 Octobre.
10. Assigbétse K., Leroy C., Pettway R., Savary S. et D. Fernandez. 1997. Evolution spatio-temporelle d'une population de *Rhizoctonia solani*, agent du flétrissement des gaines du riz, aux Philippines. Communication orale présentée aux "**Journées Jean Chevaugéon - Rencontres de Mycologie - Phytopathologie**", Aussois, 5-9 Octobre.
11. Fernandez D., Noir S., Bon M-C., Combes M-C., Silva M.C., Guerra-Guimarães L., Anthony F., Bertrand B. and Lashermes P. 2001. Molecular physiology and genetics of coffee resistance to parasites. Communication orale à la **19th International Conference on Coffee Science (ASIC)**, Trieste, Italie, 14-18 Mai.
12. Fernandez D., Silva M., Santos P., Petitot A.S., Guerra-Guimarães L., Ribeiro A. and Nicole M. 2004. La réaction hypersensible du caféier à *Hemileia vastatrix*, agent de la rouille orangée : caractérisation cytologique et moléculaire. Communication aux Journées J. Chevaugéon – **Vème rencontres de Phytopathologie/mycologie**, Aussois, 18-22 Janvier.
13. Santos P., Silva M., Guerra-Guimarães L., Ribeiro A. and Fernandez D. 2004. "Identification of genes induced during the interaction of coffee (*Coffea arabica*) - orange rust (*Hemileia vastatrix*)." Communication au **4^o Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia**, Universidade do Algarve, 4-6 Février.
14. Ganesh D., Petitot A.-S., Alary R., Santos P., Ribeiro A., Silva M., Guerra-Guimarães L. and Fernandez D. 2004. Characterization of the early response of coffee to *Hemileia vastatrix* using real-time quantitative RT-PCR. Communication orale à la **20th International Conference on Coffee Science**, ASIC, Bangalore, Inde, 12-15 Octobre.
15. Santos P., Machado E., Gouveia M.M., Fernandez D., Chen Z., Rodrigues C. J., Lidon F. C., Ramalho J., and Ribeiro A. 2004. Gene expression analysis of *Coffea spp.* exposed to biotic and abiotic stresses. Communication présentée au **XIV Congresso Nacional de Bioquímica**, Vilamoura, Portugal
16. Petitot A.-S., Lecouls A.-C. and Fernandez D. 2006. Phylogenetic origins and expression analysis of a duplicated *WRKY* gene in the polyploid species *Coffea arabica*. **Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science**, ASIC, Montpellier, 11-15 Septembre.

4. Mémoires de diplôme

- 1- Fernandez D., 1984. Apport des techniques immuno-chimiques (E.L.I.S.A.) à l'étude de la compétition entre deux souches de *Bradyrhizobium japonicum*. **Diplôme d'Etudes Approfondies de Sciences Agronomiques**, U.S.T.L.
- 2- Fernandez D., 1987. Etude de la compétition entre deux souches de *Bradyrhizobium japonicum* et analyse de leurs profils de nodulation. **Doctorat**

d'Université de Physiologie et biologie des organismes et des populations,
U.S.T.L., 114pp.

5. Intretiens avec la presse

A l'occasion de la publication de nos travaux sur la truffe dans la revue Nature, nous avons été sollicités par plusieurs radios (France Culture, France-Info) et chaine de télévision (LCI) ainsi que des journaux français (Le Point, Le Figaro, Pour la science, Ca m'intéresse) et étrangers (Science News et Discovery News, USA ; Daily Telegraph, Royaume Uni)

De même, nos recherches sur le Bayoud du Palmier dattier ont fait l'objet de rapports dans la presse française (Nouvel Observateur, Libération) et étrangère (Afrique Agriculture; Helsingin Sanomat, Suède), et d'interviews à la radio (France Culture, Radio Ryad).

**ACTIVITÉS D'ENCADREMENT, D'ENSEIGNEMENT ET D'ANIMATION DE LA
RECHERCHE**

Tableau 2. Liste des stagiaires encadrés et leur devenir professionnel.

Nom	Période	Diplôme	n° article cosigné	Devenir
Doctorat				
Komi ASSIGBETSE	1990-93	Doctorat de l'Université de Montpellier II	4, 5, 24	Ingénieur de Recherches à l'IRD
Abdelaziz TANTAOUI	1990-94	Doctorat - Faculté des Sciences de Marrakech	7, 8, 9, 21, 22, 26, 28, 32	Chercheur INRA Maroc
Mohamed OUINTEN	1992-96	Doctorat de l'Université de Montpellier II	7, 8, 9, 26, 28, 32	Enseignant chercheur en
Marie-Pierre DUBOIS	1992-97	Doctorat de l'Université Paris XI-Orsay	4, 5	Ingénieur d'Etudes au CNRS
Patricia SANTOS	2001-2005	Doctorat de l'Université de Madeira,	18, 31	Post-doctorat
Daniel RAMIRO	2005-2008	Doctorat de l'Université de Montpellier II	32,33	
Erika BARROS	2005-2008	Universidade do Rio Grande do Sul, Brésil	36	
DEA				
Thomas GUILLEMEAUD	1994	DEA Université de Montpellier II	6	CR2 INRA
Sylvain FAUGERON	1996	DEA Université de Montpellier II		Doctorat
Guillaume BERTAULT	1997	DEA Université de Montpellier II	11, 15, 33	Post-doctorat
Caroline AGOSTINI	2000	DEA Université de Montpellier II	18	Professeur des écoles
DESS				
Arnaud BERTHOMIEU	1996	DESS Université de Bordeaux II	11, 33	Assistant-Ingénieur CNRS
Xavier ARGOUT	2003	DESS Université de Montpellier II	18	CDI Ingénieur CIRAD
Maitrise				
Claire SABBADINI	2001	Maitrise IUP Toulouse III		Responsable chez Silab (fabricant cosmétiques)
Jennifer THOMAS	2001	Maitrise de l'Université Paris XI-Orsay		DESS en 2002
Stéphane SENEAL	2002	Maitrise Université de Montpellier II		Ingénieur Agronome

1. Encadrement d'étudiants ou de chercheurs

Le tableau 2 présente la liste des stagiaires encadrés et leur devenir professionnel.

Maîtrise

- Claire SABBADINI (6 mois). 2001. Maitrise IUP Bioingénierie, Biotechnologies Végétales, Univ. P. Sabatier, Toulouse III
- Jennifer THOMAS (6 mois). 2001. Maitrise Biologie des Ecosystèmes et des Populations, Univ. Paris-Sud.
- Stéphane SENEAL (3 mois). 2002. Maitrise Physiologie Végétale, Univ. Montpellier II.

DESS

- Arnaud BERTHOMIEU. 1996. Diversité et structure génétique de populations de *Tuber melanosporum*. DESS "Biotechnologies des Champignons" de l'Université de Bordeaux II (codirection M. Raymond, Institut des Sciences de l'Evolution, Univ. Montpellier II; G. Callot, INRA, Montpellier).
- Xavier ARGOUT. 2003. Mise en place d'un pipeline d'annotation automatique associé à une base de données d'expression de gènes chez deux plantes pérennes tropicales (Caféier et Casuarina). DESS Bioinformatique, Université Montpellier II (codirection D. Bogusz, IRD).

DEA

- Thomas GUILLEMEAUD. 1994. Structure génétique de populations de *Tuber aestivum*. DEA "Biologie de l'Evolution et Ecologie", Université de Montpellier II. (codirection M. Raymond, Institut des Sciences de l'Evolution, Univ. Montpellier II; G. Callot, INRA, Montpellier).
- Sylvain FAUGERON. 1996. Structure génétique de populations de *Colletotrichum gloeosporioides*, responsable de l'antracnose du Caféier. DEA "Biologie de l'Evolution et Ecologie", Université de Montpellier II.
- Guillaume BERTAULT. 1997. Approche génétique de la structuration des populations de la truffe noire *Tuber melanosporum*. DEA "Biologie de l'Evolution et Ecologie", Université de Montpellier II. (codirection M. Raymond, Institut des Sciences de l'Evolution, Univ. Montpellier II; G. Callot, INRA, Montpellier).
- Caroline AGOSTINI, 2000. Identification de gènes impliqués dans la résistance spécifique du caféier (*Coffea arabica* L.) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*). DEA "Développement et Adaptation des Plantes : Biologie Moléculaire Intégrative", Université de Montpellier II.

Thèses

- Komi ASSIGBÉTSE. 1993. Pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, agent de la fusariose du cotonnier. Doctorat de l'Université de Montpellier II (encadrement d'une partie de la thèse).

- Abdelaziz TANTAOUI. 1994. Caractérisation moléculaire et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, responsable de la fusariose vasculaire (Bayoud) du palmier dattier. Doctorat d'Etat de la Faculté des Sciences de Marrakech, Université Cadi Ayyad, Maroc. (codirection J.P. GEIGER).
- Mohamed OUINTEN. 1996. Diversité et structure génétique des populations algériennes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent de la fusariose (Bayoud) du palmier dattier. Doctorat de l'Université de Montpellier II (codirection J.P. GEIGER).
- Marie-Pierre DUBOIS. 1997. Etude de la variabilité génétique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, champignon pathogène du cotonnier. Doctorat de l'Université Paris XI-Orsay (codirection J.P. GEIGER).
- Patricia SANTOS (2001-2005), Physiologie moléculaire de la résistance spécifique du caféier (*Coffea arabica* L.) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*). Doctorat de l'Université de Madeira, Portugal. Co-encadrement avec Mme Ana RIBEIRO, CIFC, Portugal.
- Daniel RAMIRO (2005-2008), Caractérisation moléculaire de gènes impliqués dans la réaction d'hypersensibilité du caféier à la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*), Université Montpellier II – Agro2, Co-encadrement avec Mme Mirian MALUF, Embrapa-Café, Brésil.
- Erika BARROS (2005-2008), Génomique fonctionnelle de la résistance du caféier aux nématodes à galles (*Meloidogyne incognita*), UFRGS (Universidade do Rio Grande do Sul), Brésil. Co-encadrement avec Mme Fatima GROSSI de SA, Embrapa-Cenargen, Brésil.

Autres :

- Aïda OKOLI, chercheuse Nigérienne en poste d'accueil Octobre 1992 – Juin 1993 : Analyse moléculaire de *Verticillium dahliae*
- Chabane KAMEL, chercheur Algérien en poste d'accueil Octobre-Décembre 1995 : initiation aux techniques de PCR et de séquençage de l'ADN
- Hafida KHELAFI, chercheuse INRA Algérie en formation (bourse IAEA), Novembre-Décembre 2002 : détection de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* par PCR et analyse par RAPD de variétés Algériennes de palmier dattier.
- Ganesh DOSS, chercheur du Central Coffee Research Institute (CCRI, Karnataka, Inde), accueil 8 mois (2003 – 2004). Caractérisation des gènes spécifiquement impliqués dans la réaction hypersensible du caféier à la rouille.
- Guang-Hui DAI, Professeur à l'Université de Shanghai, Chine, accueil ESCD IRD, Juillet-Août 2004. Expression de gènes de caféier par RT-PCR et détection d'*Hemileia vastatrix* dans les tissus de caféier par PCR.
- Caroline GAUME, Licence-Pro Biologie Moléculaire, Univ. Pau et des Pays de l'Adour, Janvier-Avril 2005. Clonage des promoteurs de gènes de caféier et mise au point de tests d'agroinfiltration en vue de leur analyse fonctionnelle.
- Jean-Maurice ASSIÉ, ENFA Toulouse (CDD 8 mois 2000-2001)
- Frédéric ANDRIEU, ENFA Toulouse (CDD 10 mois 2001)

- Patrice GALAUP, ENFA Toulouse (CDD 10 mois 2002)

2. Participation à l'enseignement

- DEA de Phytopathologie (Université Paris XI - Orsay) : séminaires sur la diversité et la structure génétique des populations de champignons phytopathogènes. (1995-1996).
- Maitrise de Physiologie Végétale Appliquée (Université Montpellier II): séminaires sur la diversité génétique des *Fusarium oxysporum* et sur les marqueurs moléculaires pour l'identification des champignons. (1996- 2000).
- organisation et participation au stage de formation continue "Marqueurs moléculaires" de l'IRD à Montpellier, 11-22 Septembre 1995.
- Workshop FAO/IAEA « Hands-on experience on molecular and mutation techniques » (Seibesdorf, Autriche): cours et TP. 20 – 24 Septembre 1999.

3. Evaluation scientifique

- Plusieurs revues d'articles par an pour l'European Journal of Plant Pathology, Mycological Research, Journal of Phytopathology et Journal of Genetics and Breeding.
- Evaluation de dossiers pour l'obtention de bourses auprès de la Fondation Internationale pour la Science (FIS)
- Membre du jury de recrutement chercheurs (CR2) INRA, Département Pathologie Végétale (Mai 1999)
- Membre des jurys d'admission pour le recrutement des chercheurs (CR2 et CR1) à l'IRD (2002, 2003 et 2004)
- Membre du jury d'admissibilité CR2 de la CSS3 de l'IRD (2005)
- Participation à des jurys de thèse :
 - ◆ en tant qu'encadrante pour les thèses de M. A. TANTAOUI (1994), M. M. OUINTEN (1996), Mme M-P. DUBOIS (1997) et Mlle P. SANTOS (2005)
 - ◆ en tant qu'examinatrice invitée pour les thèses de :
 - Mlle C. ABADIE. 1995. "La fusariose du palmier à huile : influence des facteurs édaphiques et culturaux sur la gravité de la maladie". Doctorat de l'Université Paris XI - Orsay.
 - Mme V. EDEL (1999) "Développement de méthodes d'identification et de caractérisation moléculaire pour l'étude de l'écologie de *Fusarium oxysporum*" Diplôme de Doctorat de l'Université de Bourgogne.
 - M. O. RANDIG (2002) " Diversité génétique des nématodes à galles *Meloidogyne* spp. au Brésil : application au diagnostic des principales espèces parasites du caféier" Doctorat de l'Université de Perpignan.
- Participation au comité de thèse de Mlle Aurélie LECOLIER, Univ. Montpellier II, Caractérisation de la variété *Coffea arabica* var. Laurina et recherche de gènes impliqués dans la qualité organoleptique de ce café (2004)
- Participation au jurys du DESS "Biotechnologies des Champignons" de l'Université de Bordeaux II (1996)

- Membre du jury de DESS GGTAV Montpellier (2005)
- Membre du jury de recrutement d'un AJT à l'IRD (2005)

4. Expertises

Analyses :

- A la demande du Service de la Protection des Végétaux (Région Centre), analyse pour diagnostic de souches de *Fusarium oxysporum* isolées de Palmiers dattier issus de culture *in vitro*

Missions :

- Visite pour conformité du schéma de production *in vitro* de plants de Palmiers dattier (Société Palmdat)
- Missions d'expertise pour le compte de l'Agence Internationale pour l'Energie Atomique (IAEA) dans le cadre du programme Bayoud du Palmier dattier. Ces missions avaient pour objectif d'évaluer la faisabilité du programme dans les différents laboratoires de recherche concernés, et de contribuer à la coordination du projet.
 - ◆ en Tunisie (Tunis, Sfax et Tozeur), du 3 au 13 Avril 2000,
 - ◆ en Algérie, (Alger et Ghardaïa) du 14 au 18 Avril 2001
- Mission d'expertise au Vietnam sur les maladies du caféier dans le cadre d'un projet FICU (3 au 14 Décembre 2002)

5. Responsabilités administratives

- Membre élu à la Commission Administrative Paritaire Chercheurs de l'IRD (2001 – 2004)
- Membre élu au Comité Technique Paritaire Local et au Comité Local Hygiène et Sécurité de l'IRD de Montpellier (2003 – 2006)

6. Animation scientifique

- Membre du comité d'organisation du groupe de travail SFP "Biologie et génétique des populations de champignons", Montpellier, 22-23 Mai 1995
- Membre du comité d'organisation des "Journées Jean Chevaugéon - Rencontres de Mycologie - Phytopathologie", Aussois, 5-9 Octobre 1997
- Membre du comité d'organisation des "Journées Jean Chevaugéon - Rencontres de Mycologie - Phytopathologie", Aussois, 15-19 Janvier 2006
- Organisation de réunions mensuelles bibliographiques à l'IRD sur le thème de la Résistance des plantes (2001-2004)

7. Financements de recherche

- Action Concertée et Coordonnée pour les Sciences du Vivant du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche : ACC-SV N°7 "Etude comparative de la diversité et de la complexité des populations parasites en fonction de la gestion des résistances des populations de plantes hôtes" (1996-1997), budget : 60 000 FF.

- Projet Inco de l'UE NemaCoffee "Breeding tools for durable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) of coffee varieties in Latin America" (2001-2004), budget : 58500€..
- Projet financé par le CNPq/SCI (Brésil), (2002-2004) "Análise molecular das variedades de café do IAC: caracterização da resistência a pragas e doenças"(IRD et IAC), budget 5000€ / an (missions).
- Projet " Etude de la mort cellulaire associée à la réaction hypersensible des plantes aux champignons pathogènes". Programme de coopération scientifique et technique Franco-Portugais, (2000 – 2004), budget 5000€ / an (missions) .
- Projet " Genetic improvement of coffee varieties for durable resistance to leaf rust " Plate-forme de recherches avancées pour la Génomique et les Biotechnologies, Agropolis, Montpellier (2002-2003), accueil de 2 chercheurs Indiens 8 mois chacun.
- Projet " Gènes de résistance du caféier ". Génopôle Montpellier (2001-2002), budget pour séquençage 1000 ESTs.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Remarque : les références citées dans ce texte et dont je suis auteur ou co-auteur sont associées à une lettre [A pour article, C pour chapitre] suivie d'un numéro qui correspond à la liste présentée dans mon *curriculum vitae*.

1. Thématique générale et objectifs des recherches

Essentiellement chimiques, les méthodes de lutte contre les parasites utilisées jusqu'à présent en protection des cultures ont de multiples inconvénients, comme l'induction de résistance des agents pathogènes aux produits phytosanitaires ou des risques pour la santé humaine et l'environnement. La perception de ces risques incite aujourd'hui à une réorientation des stratégies de protection des plantes, davantage en phase avec les exigences actuelles en matière de sécurité alimentaire, de développement d'une agriculture durable, et de préservation des ressources naturelles. Afin de réduire les dommages causés aux plantes cultivées par les agents pathogènes, tout en limitant l'usage des produits phytosanitaires, il est nécessaire d'agir à plusieurs niveaux.

Au niveau de la plante, la création de variétés résistantes à plusieurs parasites, ou portant de nouvelles résistances à certaines maladies peut être envisagée, notamment par croisement entre variétés de la même espèce ou par introgression de gènes à partir d'espèces apparentées. Les programmes d'amélioration génétique des plantes ont, jusqu'à présent, privilégié l'utilisation des gènes de résistance (gènes *R*) chez de nombreuses espèces cultivées. Ces gènes, naturellement présents chez les plantes, leur confèrent une résistance totale à un agent pathogène. Bien que cette stratégie se soit révélée efficace dans quelques cas particuliers (Hulbert *et al.*, 2001), elle peut, cependant se révéler dangereuse dans la mesure où, d'une façon générale, les gènes *R*, hautement spécifiques, favorisent la sélection de populations ou l'évolution de parasites capables de contourner cette résistance. Un bon exemple est celui de la rouille du caféier (*Coffea arabica*) où, en quelques décennies, tous les gènes de résistance sélectionnés ont été surmontés, près de 45 races du parasite ayant été identifiées à ce jour (Varzea & Marques, 2005).

Afin de limiter le risque de contournement des résistances variétales, des stratégies de gestion des cultures ont été proposées à l'échelle de la parcelle, ou à une échelle plus vaste, définie en fonction des capacités de dispersion de chaque parasite (Brown, 1995 ; McDonald and Linde, 2002; Mundt *et al.*, 2002). Ainsi, des pratiques culturales comme l'alternance variétale, la rotation culturale ou l'association de variétés portant des résistances différentes permettraient de limiter les pressions de sélection exercées sur les populations pathogènes. A l'heure actuelle, ce n'est qu'en combinant l'utilisation de variétés résistantes à des méthodes de contrôle culturales, et éventuellement chimiques, qu'une réduction du développement des parasites pourrait être obtenue.

La recherche fondamentale doit désormais s'orienter vers des approches visant à optimiser la gestion des populations de parasites et à aboutir à une durabilité des

résistances variétales. Il est donc indispensable d'acquérir au préalable une bonne connaissance de la biologie, de la diversité et de la variabilité génétique des parasites. D'un autre côté, la recherche de nouvelles sources de résistance plus stables, c'est-à-dire moins susceptibles d'être contournées à court terme par l'évolution des populations de parasites, s'avère nécessaire.

Nos travaux de recherche s'inscrivent dans cette démarche et ont pour objectifs généraux de fournir des connaissances utiles au développement de méthodes de gestion des populations d'agents pathogènes, d'une part, et à l'élaboration de nouvelles stratégies d'amélioration des plantes pour la résistance, d'autre part.

Nos activités se sont ainsi développées autour de deux axes complémentaires : l'étude de la diversité génétique et de la dynamique évolutive des populations de champignons phytopathogènes (1990 à 1999), et l'étude des mécanismes génétiques et moléculaires de la résistance des plantes aux parasites (2000 à 2006).

Pour notre premier axe de recherche, nous avons choisi comme modèle biologique l'espèce *Fusarium oxysporum* pour l'importance agronomique que représentent les dépérissements occasionnés par ce champignon sur de nombreuses espèces végétales, dont le Cotonnier, le Palmier dattier et le Palmier des Canaries. Nos recherches sur l'organisation et l'évolution du génome des *Fusarium oxysporum* ont permis le développement de marqueurs moléculaires pour caractériser les différentes formes de virulence présentes dans les populations et étudier leurs relations phylogénétiques. Ce thème de recherches s'est enrichi par notre intégration à deux programmes menés par des équipes IRD sur le terrain, sur *Rhizoctonia solani*, parasite du riz¹ et *Colletotrichum gloeosporioides*, parasite du caféier². De plus, nous avons activement participé à un programme de recherches sur la structuration génétique des populations de *Tuber melanosporum* (la truffe noire)³. Ces dernières activités ne seront pas détaillées dans ce document.

Pour notre second axe de recherche, qui se situe dans la continuité de notre réflexion scientifique, nos travaux portent plus particulièrement sur les réponses du caféier induites par *Hemileia vastatrix*, agent de la rouille orangée. En parallèle, nous dirigeons des recherches sur la résistance du caféier aux nématodes de l'espèce *Meloidogyne*. Ces travaux ont pour but d'identifier des gènes impliqués dans la signalisation de la résistance, et permettant l'activation des mécanismes de défense du caféier aux parasites.

¹ en collaboration avec S. Savary, IRRI, Philippines

² en collaboration avec D. Nandris et F. Pellegrin, IRD Nouméa

³ en collaboration avec G. Callot, UFR Sciences du sol, INRA, Montpellier et M. Raymond, Institut des Sciences de l'Evolution, Univ. Montpellier II

Le projet de recherches que nous proposons pour les années à venir est dans le prolongement de nos travaux et propose de comprendre et d'étudier le rôle et le fonctionnement de gènes de caféier dans la résistance aux parasites. A court terme, ces recherches pourront déboucher sur des outils ou des applications tels que des marqueurs moléculaires utilisables en sélection variétale, et l'optimisation des ressources génétiques caféières. A plus long terme, la connaissance des mécanismes physiologiques et moléculaires qui sous-tendent la résistance aux agents pathogènes, pourrait permettre le développement de moyens de lutte plus spécifiques et plus respectueux de l'environnement que les méthodes traditionnelles.

2. Diversité et structure génétique des populations de *Fusarium oxysporum*.

2.1. Avant propos

Bien que mentionnées dès l'Antiquité, de nombreuses maladies d'origine fongique, telles que les rouilles et les mildious, n'ont cependant fait l'objet d'études approfondies qu'à partir de la fin du 19^{ème} siècle⁴. Après une phase d'études descriptives, les pathologistes s'intéressèrent à la biologie des microorganismes phytopathogènes et à l'épidémiologie des maladies. Ce n'est qu'au milieu du 20^{ème} siècle que les premières hypothèses sur les bases génétiques de la résistance et de la virulence furent établies par Flor (1956, 1971)⁵ et Vanderplank (1968)⁶. Tous les programmes de sélection de plantes résistantes se sont alors fondés sur ces concepts.

Si d'importants efforts dans la sélection génétique des plantes ont alors été entrepris, en revanche la génétique des populations des parasites a été bien souvent négligée pour de nombreux pathosystèmes. Or, l'efficacité et la durabilité d'une stratégie d'utilisation de la résistance dépend du potentiel d'adaptation des populations pathogènes, en d'autres termes, de la diversité génétique existante au sein de ces populations et de leurs possibilités d'évolution. Il convenait donc d'étudier l'hétérogénéité spatiale et temporelle des populations de parasites, afin de mettre en évidence le rôle relatif des différents facteurs évolutifs (mutation, recombinaison, dérive génétique, migration et sélection par l'hôte) qui régissent la

⁴ Pour mémoire, le postulat de Koch date de 1876.

⁵ L'hypothèse "gène-pour-gène" de Flor stipule qu'à chaque gène de résistance chez une plante correspond un gène d'avirulence chez un parasite, l'interaction spécifique entre les produits des deux gènes aboutissant à une réaction de résistance. On parle alors d'interaction incompatible entre les deux partenaires. Cette hypothèse se fonde sur le concept de coévolution ou d'adaptation réciproque entre les plantes et leurs parasites.

⁶ Vanderplank suggéra qu'il existait deux types de résistance chez les plantes :

- une résistance dite verticale, contrôlée par un seul gène de résistance, dit majeur, et qui n'est effective que contre une ou quelques races du parasite (celles qui portent le gène d'avirulence correspondant). Il s'agit donc d'une résistance spécifique.
- une résistance dite horizontale, déterminée par plusieurs gènes, dits mineurs, et qui est effective contre toutes les races du parasite. Dans ce cas, il s'agit alors d'une résistance non spécifique.

structure génétique de leurs populations. Ces connaissances sont indispensables pour développer des modèles descriptifs, puis prédictifs de la dynamique adaptative des populations naturelles et ainsi définir une stratégie optimale d'utilisation des résistances variétales.

Bien que les phytopathologistes furent rapidement conscients d'une telle nécessité, les recherches sur la diversité et la structure des populations de phytoparasites n'ont réellement pu prendre de l'ampleur que récemment, grâce aux techniques de la biologie moléculaire et au développement des marqueurs moléculaires. La possibilité ainsi donnée d'analyser relativement aisément des microorganismes dont on ne connaissait rien du point de vue génétique a permis d'acquérir rapidement des connaissances sur de nombreuses espèces de champignons filamenteux, et en particulier sur celles à reproduction strictement asexuée. En complément des travaux plus traditionnels d'analyse de la diversité, il devenait alors possible d'analyser les fondements moléculaires des phénomènes observés macroscopiquement. C'est dans ce contexte "pionnier" que se situent les recherches que nous avons menées au sein de l'IRD. Mes travaux se sont intégrés à ceux du laboratoire de Phytopathologie Tropicale du Centre IRD de Montpellier, par l'étude des populations de champignons responsables de fusarioses vasculaires dans les zones Méditerranéennes et sub-tropicales.

2.2. Contexte scientifique

F. oxysporum est un champignon commun du sol dont l'espèce rassemble des souches saprophytes, qui peuvent coloniser les racines des plantes sans provoquer de symptômes ainsi que des souches pathogènes, agents de trachéomycoses ou de pourriture racinaires. *F. oxysporum* peut parasiter de nombreuses espèces végétales, aussi l'espèce a-t-elle été divisée en formes spéciales et en races sur la base de la spécificité parasitaire des individus. A ce jour, plus de 120 formes spéciales et races sont recensées (Armstrong et Armstrong, 1981). Lorsque nous avons démarré nos travaux, l'identification de l'espèce *F. oxysporum* qui repose sur la morphologie des spores et de l'appareil reproducteur du cycle asexuel passait nécessairement par l'observation microscopique du thalle. De même, la caractérisation des formes spéciales et des races était subordonnée aux tests de pouvoir pathogène sur plantes, expérimentalement lourds et souvent imprécis.

Concernant la biologie de l'espèce, *F. oxysporum* ne possède pas de cycle de reproduction sexuée connu, mais présente cependant la capacité à former des hétérocaryons par anastomose hyphale entre individus d'un même groupe de compatibilité végétative (VCG) (Leslie, 1993). Lorsque nous avons démarré ce programme, l'importance de ce phénomène dans le cycle biologique du champignon et l'existence éventuelle de recombinaison génétique au sein d'un VCG étaient encore mal connues (Correll, 1991 ;

Kistler *et al.*, 1992.). Il était présumé que les mutations ponctuelles et la recombinaison *via* l'hétérocaryose étaient les principales sources de diversification chez *F. oxysporum* et que l'espèce évoluait sous l'effet de la pression de sélection exercée par les plantes-hôtes. En d'autres termes, que les membres de chaque forme spéciale dérivait d'un même ancêtre commun, à partir duquel les VCG et les races avaient évolués. Une série de questions restaient néanmoins non résolues pour le phytopathologiste concernant la biologie et la génétique des *F. oxysporum* et sur l'évolution de l'espèce en général:

- quel est le niveau de diversité génétique au sein des formes spéciales ?
- de quelle manière se fait l'acquisition de la spécificité parasitaire et comment évoluent les races au sein des formes spéciales?
- quel rôle joue la compatibilité végétative dans la structuration des populations? Quelles sont les relations entre VCG, formes spéciales et races?
- quels sont les principaux mécanismes générateurs de variabilité chez *F. oxysporum* (et chez les champignons à reproduction asexuée en général), et leur importance relative ?
- quelles sont les relations génétiques entre formes pathogènes et formes non pathogènes (*F. oxysporum* saprophytes du sol) ?

Les réponses à ces questions peuvent avoir de fortes implications en protection des cultures, au niveau des stratégies de sélection pour la résistance, par exemple. En effet, si la spécificité parasitaire est apparue par évolution convergente dans des lignées génétiques distinctes de *F. oxysporum*, il est probable que les gènes gouvernant cette spécificité soient différents, au contraire d'une évolution par descendance. La sélection de plantes résistantes devrait donc être effectuée en tenant compte de ces différences potentielles. De même, pour le contrôle des populations de *F. oxysporum*, la connaissance de la diversité génétique et des relations phylogénétiques au sein de l'espèce *F. oxysporum* est indispensable au développement d'outils de caractérisation des *F. oxysporum* pathogènes à différents niveaux infra-spécifiques (forme spéciale, race, VCG, etc....). Le niveau de diversité étant, lui, un bon indicateur des capacités d'évolution de l'espèce, les données obtenues sur la diversité génétique et pathogénique des formes spéciales permettraient de prédire les risques d'adaptation des populations au déploiement de nouvelles résistances.

Nos travaux de recherches ont tenté de répondre à quelques unes de ces questions, en se focalisant sur la caractérisation et l'étude de la diversité génétique des populations de *F. oxysporum* pathogènes. Les nouveaux outils disponibles grâce aux progrès de la biologie moléculaire étaient prometteurs en terme d'identification des espèces et de génétique des populations des microorganismes. En parallèle à la caractérisation des VCGs et du pouvoir

pathogène, nous avons développé des marqueurs moléculaires, informatifs à l'échelle intra-spécifique, pour appréhender la structuration génétique des populations de *F. oxysporum*.

2.3. Objectifs

L'objectif premier des études réalisées dans le cadre de ce programme était d'obtenir des données sur le taux de diversité génétique et pathogénique des populations de *F. oxysporum* considérées, pour le développement de stratégies de contrôle et de gestion de leurs populations. Pour chaque modèle biologique étudié, la diversité des *F. oxysporum* et la structure de leurs populations ont été analysées dans les aires d'extension de chaque maladie et mises en relation avec la résistance de leurs plantes-hôtes. Sur le plan appliqué, l'objectif de ces études était d'obtenir des outils performants de caractérisation et de détection du pathogène, utilisables en laboratoire ou sur le terrain pour des études d'épidémiologie. Au plan fondamental, les études réalisées dans le cadre de ce programme visaient aussi à l'acquisition de connaissances fondamentales sur l'organisation génétique des formes spéciales de *F. oxysporum*.

2.4. Modèles d'étude

Nous avons choisi d'étudier deux modèles représentatifs, l'un sur culture annuelle, l'autre sur culture pérenne en milieu aride. Il s'agit de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*), agent de la fusariose du cotonnier (*Gossypium* sp.), et de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (*Foa*), agent de la fusariose (ou Bayoud) du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). Dans ce dernier cas, en raison des similitudes que présentaient les deux maladies, l'étude a été étendue au *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*, qui parasite une autre espèce de Phoenix (*P. canariensis*). Ces travaux ont été conduits en collaboration avec plusieurs équipes, Française (T. Langin et M-J. Daboussi, Univ. Paris XI) et étrangères (N. Ahmed, G. Ibrahim, Agricultural Research Corporation, Wad Medani, Soudan ; A. Tantaoui, INRA Marrakech, Maroc ; M. Ouinten, INRA Alger, Algérie ; C. Kistler, Univ. Gainesville, USA), et ont fait l'objet de cinq thèses, dont trois que nous avons entièrement dirigées. Dans le cadre de son Doctorat (dir. J-P. Geiger), M. K. Assigbétse a entrepris la caractérisation moléculaire des souches de *Fov* sous notre direction (1993). Nous avons ensuite dirigé la thèse de Doctorat de Mlle M-P. Dubois (1993-1997) sur l'analyse de la variabilité génétique des populations de *Fov*. En parallèle, M. A. Tantoui (1991-1994) et M. M. Ouinten (1993-1996) étudiaient la diversité génétique des populations marocaines et algériennes de *Foa*, sous notre direction. Enfin, l'analyse de *Foc* a été entreprise dans le cadre du PhD de Mlle T. Plyler (dir. H. Kistler). Les résultats ont fait l'objet de dix publications dans des revues internationales, 2 chapitres d'ouvrage et 7 communications à des congrès. D'abondants travaux ont été publiés sur *F. oxysporum* pendant la période durant laquelle nous avons mené ce

programme. Nos résultats ont été pris en compte dans plusieurs publications d'équipes françaises et étrangères et ont été intégrés dans les modèles qui ont été développés par la suite (Gordon et Martyn, 1997 ; Baayen *et al.*, 2000).

Nous présentons ici les principaux résultats obtenus sur chacun des modèles indépendamment, puis nous conclurons en synthétisant les avancées apportées par ces travaux sur la génétique des populations de *F. oxysporum*.

2.5. La Fusariose du cotonnier

La fusariose du cotonnier (*Gossypium* spp) est le premier cas de flétrissement vasculaire attribué à un *F. oxysporum* qui a été décrit (Smith *et al.*, 1981). A l'heure actuelle, c'est une maladie qui cause encore d'importantes pertes de récolte et qui est répandue dans la plupart des zones de culture cotonnière. Plusieurs travaux ont montré que la forme spéciale *vasinfectum* se démarque des autres par une gamme d'hôtes étendue, le *Fov* pouvant également attaquer au champ des hôtes aussi divers que le soja (*Glycine max*), le tabac (*Nicotiana tabacum*) et la luzerne (*Medicago sativa*) (Armstrong et Armstrong, 1975). Chez le cotonnier (*Gossypium* sp.), plusieurs espèces peuvent être parasitées par différentes races du champignon (Tableau 1 et Armstrong and Armstrong, 1978).

L'analyse d'une collection d'une cinquantaine de souches de *Fov* provenant de différents pays, et de souches représentant chacune des races du parasite décrites jusqu'alors, a été entreprise, dans un premier temps, afin d'évaluer la diversité pathogénique et génétique de la forme spéciale *vasinfectum* dans son ensemble et à l'échelle mondiale. L'étude a ensuite été étendue à l'analyse d'un cas particulier au Soudan, à une échelle locale où se posait le problème de contournements de résistance.

Les tests de pathogénie réalisés sur une gamme de cotonniers ont classé les souches de notre collection en trois races dont la distribution géographique est bien différenciée (Assigbétse *et al.*, 1994 [A4] et thèse M.P. Dubois, 1997).

Tableau 1. Réactions de différents cultivars de cotonniers (*Gossypium* sp.) utilisés dans la différenciation des races de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Assigbétse *et al.*, 1994).

Espèces cultivars	<i>G. hirsutum</i>		<i>G. barbadense</i>		<i>G. arboreum</i>
	ISA 205	ACALA	ASHMOUNI	SAKEL	CG17
Races					
A	S	S	S	S	R
3	R	R	R	S	S
4	R	R	R	R	S

S : sensible ; R : résistant définis au seuil de 50 % de plantes présentant les symptômes de la fusariose

L'utilisation d'outils moléculaires tels que les RFLP⁷ et les RAPD⁸ a montré une diversité génétique importante des isolats à l'échelle de la forme spéciale et des marqueurs de polymorphisme informatifs à l'échelle des populations de *Fov* ont été caractérisés (Assigbétse *et al.*, 1994 [A4] ; Fernandez *et al.*, 1994 [A5]). Par ailleurs, la technique RAPD s'est révélée prometteuse pour être utilisée comme outil d'identification des races chez *Fov*, en substitution aux tests d'inoculation sur cotonnier (Assigbétse *et al.*, 1994 [A4]). De plus, nous avons mis en évidence que la forme spéciale *vasinfectum* possédait deux origines phylogénétiques distinctes, les isolats de race 3 se distinguant systématiquement des autres par tous les marqueurs utilisés. Ce résultat a été confirmé par une étude phylogénétique basée sur le séquençage de plusieurs gènes de *F. oxysporum* (Fig. 1 et O'Donnell and Cigelnik, 1999 ; Skovgaard *et al.*, 2001).

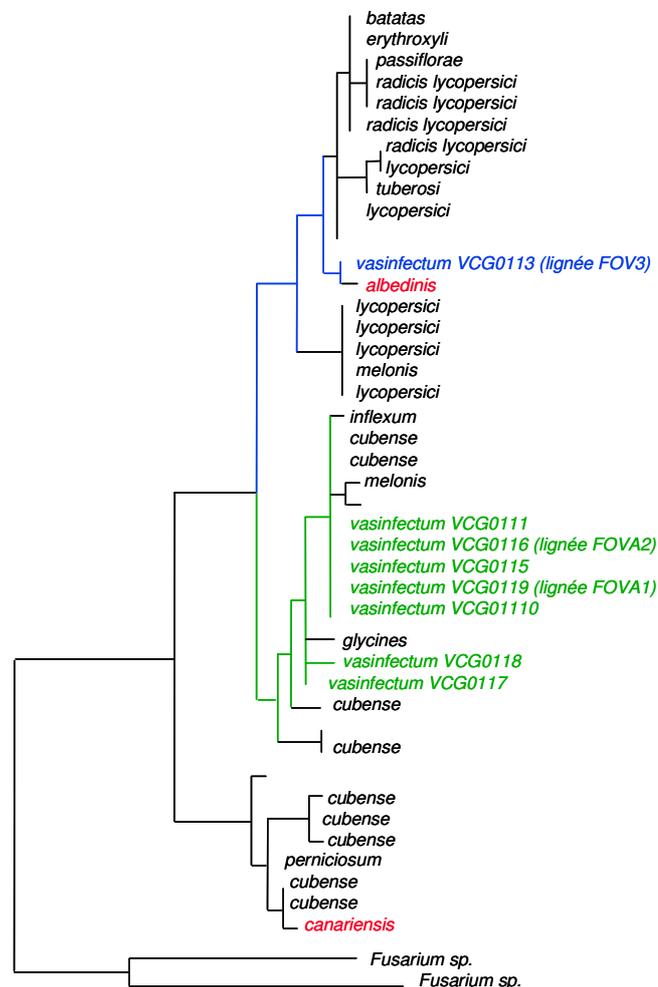


Fig. 1: Phylogramme de plusieurs souches de *F. oxysporum* appartenant à différentes formes spéciales obtenu par le logiciel PAUP (méthode de parcimonie) sur la

⁷ RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism)

⁸ RAPD : amplification aléatoire d'ADN polymorphe (Random Amplified Polymorphic DNA)

base des données de séquençage des gènes *EF-1 α* et *mtSSU rDNA* (données fournies par K. O'Donnell)

Un autre résultat important est la corrélation observée entre les caractéristiques moléculaires et parasitaires des isolats et leur appartenance à un VCG (Fernandez *et al.*, 1994 [A5]). La mise au point de nouveaux marqueurs moléculaires (sondes RFLP issues de fragments RAPD, éléments transposables) et l'établissement des caryotypes des souches par électrophorèse en champs pulsés ont permis de confirmer la proximité génétique des souches au sein des VCG et de mettre en évidence une structuration en quatre lignées clonales majeures des populations de *Fov* étudiées (thèse M.P. Dubois, 1997 ; Brygoo *et al.*, 1998 [C1]).

Ces lignées clonales présentent une distribution géographique hétérogène mais ne semblent jamais co-exister, ce qui permet d'envisager des stratégies simples de déploiement de sources de résistance adaptées à chaque région de culture. Il aurait été intéressant de pouvoir étendre nos analyses à un échantillonnage plus important de souches dans les régions géographiques étudiées pour confirmer ces résultats. Des travaux récents réalisés par d'autres équipes sur des souches collectées en Californie (Kim *et al.*, 2005) et Côte d'Ivoire (Abo *et al.*, 2005) ont montré une diversification importante des souches, probablement due à de nouvelles introductions du parasite en provenance d'autres régions.

2.6. Le Bayoud du palmier dattier

Le Bayoud est une fusariose vasculaire du palmier dattier (*P. dactylifera* L.), dont l'aire d'extension est limitée au Maroc et à l'Algérie (Louvet et Toutain, 1981). Cette maladie qui a provoqué la mort de plusieurs millions d'arbres au cours du 20^{ème} siècle constitue un véritable fléau au plan économique, par son incidence directe sur la production de dattes, en particulier les meilleures variétés très sensibles à la maladie, mais aussi au plan écologique car elle met en danger le fragile équilibre de l'écosystème oasien. Quelques variétés de palmier naturellement résistantes à la maladie ont été identifiées. Du fait de leur nature ligneuse et surtout de leur croissance très lente, les palmiers sont des modèles d'étude difficiles à mettre en œuvre et nous n'avons donc que peu de connaissances sur les mécanismes physiologiques et génétiques conduisant à l'expression de la maladie ou de la résistance. Par ailleurs, les tests d'inoculation artificielles sont laborieux, et les résultats parfois difficiles à interpréter sur des plantules. Les programmes de lutte actuels contre la fusariose portent sur la sélection par voie génétique et la diffusion de variétés de palmiers résistantes de bonne qualité agronomique. Dans ce contexte, une bonne connaissance des populations de ce champignon était nécessaire, afin d'appréhender les niveaux de diversité génétique dans toute l'aire géographique d'extension de la maladie d'une part, et d'obtenir

des outils rapides de caractérisation et de détection du *F. oxysporum* sp. *albedinis* (*Foa*) d'autre part.

Sur la base des différents rapports retraçant l'histoire de l'épidémie, nous nous sommes fixés comme objectifs principaux d'analyser la structure des populations de *Foa* au Maroc et en Algérie, et de vérifier l'hypothèse d'une origine monophylétique de ces populations, comme résultat de la dissémination d'un même clone virulent dans ces deux pays limitrophes.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons supervisé plusieurs prospections en Algérie et au Maroc afin de collecter des souches de *Foa*, d'une part, dans des localités géographiquement très distantes les unes des autres et/ou représentant les différentes typologies de l'épidémie et, d'autre part, à partir de différents clones de dattier. Cette étude a été élargie à une population de *F. oxysporum* (FO) de racines de palmiers dattiers et du sol, récoltés dans une palmeraie infestée au Maroc.

Les analyses effectuées à l'aide de différentes techniques (RFLP, RAPD, fingerprints, VCG) n'ont révélé que très peu de diversité génétique entre les 120 souches de *Foa*, quelle que soit leur origine géographique ou le cultivar hôte à partir duquel elles avaient été isolées (Tantaoui *et al.*, 1996 [A7] ; Fernandez *et al.*, 1997 [A8] ; thèse M. Ouinten, 1996). Le fait que les isolats de *Foa*, collectés au Maroc et en Algérie, à partir de différents clones de palmier dattier et dans des palmeraies présentant différentes situations de la maladie, soient génétiquement très proches, montre que la distribution spatiale de *Foa* constitue bien le reflet d'événements de migration de l'agent pathogène, par la dissémination d'un seul clone pathogène plutôt que par l'évolution indépendante d'un ou plusieurs clones, dans différentes localités. La mise en évidence de cette homogénéité génétique du parasite fournit de bons espoirs quant au succès d'une stratégie de développement durable de variétés résistantes chez le palmier.

L'utilisation de l'élément transposable *Fot1* (Daboussi *et al.*, 1992) comme sonde d'ADN répétée dispersée pour établir des empreintes génétiques, a permis d'identifier 52 génotypes ("*Fot1*-fingerprints") chez *Foa* (Tantaoui *et al.*, 1996 [A7] ; thèse M. Ouinten, 1996 ; Fernandez et Langin, 2002 [C4]). La distribution spatiale des génotypes dans les différentes palmeraies a pu être mise en relation avec les données historiques sur la propagation du Bayoud d'une palmeraie à l'autre, et est en cohérence avec les données épidémiologiques (Tantaoui *et al.*, 1996 [A7] ; thèse M. Ouinten, 1996). Les essais d'inoculation ont montré des variations quantitatives de l'agressivité des souches, mais n'ont pas pu établir de relations avec leur génotype (thèse M. Ouinten, 1996). Nous avons mis en évidence qu'une partie de la variabilité observée dans les fingerprints était due à des insertions différentielles des copies de *Fot1* dans le génome des souches contribuant ainsi à

l'évolution moléculaire de cet organisme asexué (Fernandez *et al.*, 1998 [A9] ; Fernandez et Langin, 2002 [C4]).

Nous avons observé une diversité génétique importante au sein des populations de FO saprophytes issus de racines de palmier ou du sol d'une palmeraie infestée : plusieurs VCG, haplotypes RFLP et groupes RAPD ont été mis en évidence (Tantaoui et Fernandez, 1993 [A21] ; Fernandez et Tantaoui, 1994 [A22]). Par ailleurs, toutes les analyses effectuées ont montré que les souches de *Foa* représentent un groupe phylogénétique distinct de tous ceux mis en évidence chez les FO. Cette caractéristique a été mise à profit pour développer des oligonucléotides spécifiques de *Foa*. Dans le cadre d'un séjour de 2 mois dans l'équipe de M-J. Daboussi et T. Langin à l'Institut de Génétique Microbienne (Paris XI), nous avons construit une banque génomique de *Foa* et cloné les éléments *Fot1* de *Foa*. Nous avons ainsi identifié l'insertion stable d'une copie tronquée de *Fot1* dans le génome de *Foa*, à partir de laquelle des amorces PCR ont été définies. Un test de diagnostic rapide permettant l'identification du *Foa* par PCR a ainsi pu être mis au point (Fernandez *et al.*, 1998 [A9] ; Fernandez et Langin, 2002 [C4]).

2.7. La Fusariose du Palmier des Canaries

Dans le cadre de ce programme, l'étude a été élargie à *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, responsable de la fusariose vasculaire du palmier des Canaries (*Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud) dont l'importance ne cesse de croître. Au contraire du Bayoud du palmier dattier qui reste circonscrit au Maghreb, cette maladie est répandue dans de nombreux pays, mais les symptômes des deux maladies étant très similaires, il avait été supposé que les deux agents pathogènes pourraient être identiques (Mercier et Louvet, 1973 ; Louvet, 1990). Nous avons montré que les formes spéciales *albedinis* et *canariensis* présentaient des caractéristiques génétiques très différentes, et ne pouvaient donc pas dériver l'une de l'autre (Plyler *et al.*, 2000 [A13]). La structure des populations de *Foc* a été étudiée en collaboration avec le département de Phytopathologie de l'Université de Floride (USA). En parallèle aux tests de pouvoir pathogène, des analyses très fines ont été menées à l'aide de techniques RFLP et fingerprint, sur un large échantillon de souches de *Foc* recueillies dans de nombreuses régions du monde. La comparaison de leurs "empreintes" génétiques a conclu qu'il n'existe qu'une seule lignée génétique rassemblant des individus très semblables (Plyler *et al.*, 2000 [A13]). Comme pour *Foa*, la propagation d'une même souche virulente de *Foc* serait à l'origine de l'ensemble des foyers de fusariose pour ces palmiers. Ainsi, il peut être envisagé une stratégie de développement de variétés résistantes chez cette espèce de palmier à l'échelle internationale. De même que pour *Foa*, un test moléculaire d'identification et de détection du *Foc* a été mis au point qui facilite la certification des clones pour des échanges commerciaux (Plyler *et al.*, 1999 [A12]).

2.8. Conclusions

Nos travaux, entrepris dans le cadre de ce premier axe de recherche sur l'étude de la diversité génétique et de la dynamique évolutive des populations de champignons phytopathogènes, ont permis d'apporter de nouvelles connaissances fondamentales sur la structuration des populations de *F. oxysporum*, ainsi que sur l'organisation et l'évolution génétique de cette espèce fongique. Ces travaux ont aussi eu des retombées appliquées, ainsi que de fortes implications en terme de formation, notamment pour trois chercheurs du Sud (K. Assigbétse, M. Ouinten et A. Tantaoui).

2.8.1. Amélioration des connaissances

Nos études, associées à celles de la littérature sur d'autres formes spéciales (Kistler, 1997 ; Gordon and Martyn, 1997 ; Baayen *et al.*, 2000), ont permis de répondre à quelques unes des questions qui étaient posées concernant l'organisation et l'évolution des formes spéciales de *F. oxysporum* et leurs relations avec les formes saprophytes. Nous avons pu montrer que les populations de *F. oxysporum* sont constituées de lignées clonales, rassemblées en VCG. Il était soupçonné que les VCG représentaient des unités évolutives indépendantes au sein de l'espèce, aucun échange génétique n'étant possible entre elles à cause des barrières biologiques constituées par l'incompatibilité végétative. Les analyses que nous avons menées par une approche moléculaire ont permis de démontrer effectivement l'évolution indépendante des VCG. L'origine polyphylétique de nombreuses formes spéciales de *F. oxysporum*, dont *Fov*, rend le concept de forme spéciale artificiel et de peu de valeur prédictive sur la diversité génétique et pathogénique du parasite. Nos travaux se sont intégrés à ceux d'un groupe international afin d'établir une nomenclature commune de VCG et permettre des comparaisons entre formes spéciales (Kistler *et al.*, 1998). Plusieurs modèles d'évolution des populations de *F. oxysporum* pathogènes ont été proposés pour évaluer le(s) rôle(s) joués par la compatibilité végétative et la spécificité parasitaire dans la structuration des populations (Kistler, 1997). Le rôle de la sélection exercée par les gènes de résistance de la plante-hôte est certainement important mais nous avons aussi observé que la mutation, la migration et la dérive génétique sont des facteurs d'évolution majeurs de la structuration génétique des populations de *F. oxysporum* parasites des plantes cultivées.

D'autre part, certaines hypothèses restaient à vérifier quant aux mécanismes générateurs de variabilité chez ce parasite. Au niveau du génome, une grande plasticité chromosomique a été mise en évidence chez *Fov* et *Foa*, ainsi que la présence de plusieurs éléments transposables (Tantaoui *et al.*, 1996 [A7]; thèse M.P. Dubois, 1997 ; Fernandez et Langin, 2002 [C4]), suggérant que des remaniements chromosomiques et/ou des transpositions pourraient être des facteurs d'évolution compensateurs de l'absence de

recombinaison méiotique au sein de cette espèce à reproduction asexuée. Cette plasticité de l'organisation génétique chez *F. oxysporum* pourrait expliquer en partie la forte adaptabilité écologique de *F. oxysporum*, que ce soit à différents environnements (sol, plantes- hôtes) ou à différentes conditions climatiques (Fravel *et al.*, 2003).

Les marqueurs moléculaires sont des outils de génétique puissants qui permettent de caractériser, de façon dynamique, les populations et les facteurs qui conditionnent l'évolution de ces populations face aux contraintes naturelles ou anthropiques. Dans le cadre de nos travaux, le rôle joué par ces facteurs, et leur importance relative, n'a pas toujours pu être évalué de façon précise. Ainsi, l'importance de la clonalité dans la structuration des populations de *F. oxysporum*, par exemple, peut avoir été surestimée à cause de la dissémination rapide du parasite, liée aux activités humaines. Il serait intéressant de développer des approches permettant d'appréhender, de façon dynamique, l'étude des populations de *F. oxysporum*, en prenant aussi en compte les populations saprophytes, dans des milieux naturels, moins soumis aux activités agricoles.

2.8.2. Applications pratiques

Gestion des résistances :

Comme précisé plus haut, l'organisation simple des populations de *F. oxysporum* pathogènes permet de limiter le développement de sources de résistance à quelques variétés de la plante-hôte. L'utilisation d'une ou quelques souches de référence selon le parasite concerné est suffisante pour les tests de résistance et le déploiement des variétés ainsi sélectionnées peut être immédiatement envisagé dans les régions d'extension de chaque lignée génétique du parasite.

Epidémiologie des fusarioses et incidence sur les stratégies de contrôle des populations parasitaires :

Nos travaux ayant prouvé que la propagation de la maladie dans des zones jusque-là indemnes était liée à la dissémination du parasite *via* le transport de plants infectés et non à l'émergence de nouvelles formes pathogènes, les conséquences en matière de protection des cultures impliquent des mesures prophylactiques strictes pour l'échange de matériel végétal. Les outils de caractérisation moléculaire de *Foa* et de *Foc* développés lors de ces recherches sont utilisés en routine par les Services de Protection des Végétaux pour la certification sanitaire de palmiers cultivés *in vitro* avant expédition et plantation dans les pays producteurs. Au niveau des Services de Protection des Végétaux du Maroc et d'Algérie implantés dans les palmeraies, la technique de la compatibilité végétative pour l'identification du *Foa* a été préférée, pour des raisons de logistique. Enfin, nous avons pu au travers de missions d'expertise et d'ateliers organisés par la division IAEA-FAO (2000-2001), former

directement les chercheurs des pays concernés à la détection et la caractérisation moléculaire du *Foa*.

Un article en français faisant le point de toutes nos recherches sur le Bayoud du Palmier dattier a été publié dans la revue de protection des plantes *Phytoma* (Fernandez *et al.*, 1995 [A37]) et a été largement diffusée dans les institutions de recherche des pays du Maghreb. Nos travaux ont aussi fait l'objet d'une fiche d'actualité de l'IRD et ont été repris dans la presse et les médias français et internationaux.

3. Mécanismes génétiques et moléculaires de la résistance du caféier (*Coffea arabica*) aux agents pathogènes.

3.1. Contexte des recherches

Comme pour la réponse immunitaire chez les animaux, la résistance des plantes est fondée sur l'existence d'un répertoire de molécules de reconnaissance spécifiques des parasites. Les protéines codées par les gènes de résistance (gènes *R*) servent de base à un système de surveillance mis en place par la cellule végétale pour lutter contre l'infection microbienne (Dangl and Jones, 2001; Bonas & Lahaye, 2002 ; Quirino et Bent, 2003). La reconnaissance spécifique d'effecteurs du parasite, codés par les gènes d'avorulence (gènes *avr*), permet le développement très rapide d'une réaction d'hypersensibilité (HR). Cette résistance dite de gène-à-gène, conférée par l'interaction entre les gènes *R* et *avr*, protège totalement la plante de l'agent pathogène. En effet, une caractéristique essentielle de la HR est l'induction d'un processus de mort cellulaire programmé des cellules infectées, permettant de circonscrire le parasite au niveau du site d'infection (Scheel, 1998 ; Lam *et al.*, 2001). La HR est, de plus, associée à l'induction des réactions de défense au niveau de la plante entière, une forme de prémunition appelée SAR (Systemic Acquired Resistance) qui la protège de toute ré-infection par un agent pathogène (Ryals *et al.*, 1996 ; Métraux *et al.*, 2002).

La connaissance des mécanismes physiologiques et moléculaires, activés dans les cellules végétales par la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène, fait partie des enjeux de la recherche scientifique pour l'élaboration de nouvelles stratégies d'amélioration des plantes. Les étapes essentielles de la mise en place de la HR ont été bien décrites. Suite à la reconnaissance spécifique du parasite, de nombreux composants de cascades de signalisation sont activés, et une intense reprogrammation transcriptionnelle au sein des cellules végétales a rapidement lieu (Scheideler et al; 2002 ; Tao *et al.*, 2003). Parmi les mécanismes de signalisation, des réponses locales très rapides faisant intervenir des flux d'ions, la production de formes réactives de l'oxygène et de protéines telles que protéines G,

protéines MAP kinases, kinases, phosphatases, ont été identifiées chez les plantes (Somssich & Hahlbrock, 1998 ; Zhang & Klessig, 2001). L'intervention de phytohormones telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène est aussi une des caractéristiques importantes des voies de signalisation de la résistance (Malek & Dietrich, 1999 ; Reymond & Farmer, 1998). Tous ces évènements physiologiques contribuent à l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes intervenant dans la mort cellulaire, mais aussi de ceux du système de défense basal de la plante qui contrôlent la production de composés anti-microbiens et le renforcement des barrières naturelles de la plante (Dangl and Jones, 2001).

Chez *Arabidopsis thaliana*, des approches de génétique, consistant à identifier des mutants affectés dans leur réponse à des parasites, ont largement contribué à repérer plusieurs voies de régulation de la résistance et certains de leurs composants essentiels (Glazebrook, 2001 ; Nimchuk *et al.*, 2003). En modulant artificiellement le niveau d'expression de certains de ces gènes, il est possible d'augmenter la résistance de la plante au parasite ciblé, voire à plusieurs parasites différents, en s'affranchissant de la reconnaissance spécifique liée aux gènes *R* (Friedrich *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2001 ; Coppinger *et al.*, 2004). L'exemple le plus connu concerne le gène *NPR1* dont l'inactivation abolit totalement la résistance d'*A. thaliana* à la bactérie *Pseudomonas syringae* (Cao *et al.*, 1994). La surexpression artificielle du gène confère à la plante transgénique un niveau de résistance élevé à plusieurs parasites bactériens et fongiques, sans effet secondaire négatif sur la plante (Cao *et al.*, 1998 ; Friedrich *et al.*, 2001). Le rôle de ce gène est encore inconnu, bien que plusieurs travaux aient montré son implication à la fois dans la SAR (dépendante de l'acide salicylique) (Durrant et Dong, 2004), mais aussi dans l'induction d'une voie de défense dépendante de l'acide jasmonique (JA) (Dong, 2004). *NPR1* jouerait un rôle régulateur des voies de signalisation des défenses. Son activation passe par une modification du potentiel redox cytoplasmique, induite par la production d'acide salicylique, qui permet la monomérisation de la protéine, son activation et son transfert vers le noyau (Mou *et al.*, 2003). *NPR1* interagit ensuite avec des facteurs de transcription de type bZIP (basic leucine zipper) (Zhang *et al.*, 1999), qui à leur tour, induiraient l'expression des gènes codant des protéines de défense, telles que *PR1* (pathogenesis-related protein 1).

Les approches biotechnologiques axées autour de l'utilisation des gènes régulateurs ou effecteurs de la résistance constituent désormais une voie privilégiée de recherche pour le développement de plantes présentant des niveaux accrus de résistance, et susceptibles de ne pas être contournés à court terme par l'évolution des populations de parasites (Gurr et Rushton, 2005). Dans ce contexte, nos travaux de recherches se sont focalisés sur l'identification de gènes impliqués dans la signalisation de la résistance, et permettant l'activation des mécanismes de défense des plantes aux parasites.

3.2. Objectifs

Les objectifs généraux de nos recherches sont axés vers la compréhension des mécanismes impliqués dans la cascade d'évènements moléculaires et physiologiques associés à la résistance spécifique des plantes aux agents pathogènes. Le modèle d'étude est le caféier (*Coffea arabica* L.) et son interaction avec un champignon biotrophe agent de la rouille orangée, *Hemileia vastatrix*. Comme les gènes de résistance à la rouille utilisés jusqu'à présent peuvent être contournés, le choix de ce modèle est justifié par le besoin d'optimiser les programmes d'amélioration et l'utilisation des ressources génétiques des caféiers. En se basant sur les connaissances acquises chez les plantes modèles, nos travaux ont deux objectifs particuliers : celui d'identifier des gènes impliqués dans la résistance spécifique du caféier aux agents pathogènes, et celui de comprendre leur fonctionnement afin d'évaluer leur rôle effectif dans la résistance. A plus long terme, ces recherches visent l'élaboration de stratégies de sélection ou l'obtention de caféiers présentant une résistance accrue et durable aux parasites.

3.3. Modèle biologique : le caféier (*Coffea arabica* L.) et son amélioration pour la résistance

Les caféiers (*Coffea* spp.) sont des espèces forestières de sous-bois, originaires d'Afrique. L'espèce *C. arabica* représente une exception évolutive au sein du genre *Coffea* : elle serait en effet le résultat d'une hybridation spontanée entre deux espèces diploïdes sauvages ayant conduit à la formation d'un allotétraploïde naturel. L'association des deux génomes ancestraux a produit des caractères phénotypiques caractéristiques de l'espèce, en particulier une excellente qualité du grain, qui place *C. arabica* au premier rang des espèces cultivées de caféier. Les principales variétés de *C. arabica* cultivées sont hautement productives, produisent un café de bonne qualité, mais sont sensibles à plusieurs parasites et ravageurs, particulièrement dans les conditions de culture actuelles (intensification, suppression de l'ombrage). Deux parasites sont plus particulièrement dommageables à la culture de *C. arabica* et peuvent provoquer des pertes de récolte importantes : le champignon *H. vastatrix* agent de la rouille orangée, responsable d'attaques foliaires, et les nématodes du genre *Meloidogyne* responsables d'attaques racinaires.

Même si des méthodes de lutte alternatives sont possibles (utilisation de variétés de *C. canephora* résistantes aux nématodes comme porte-greffe, par exemple), elles ne sont pas forcément adaptées à la culture à grande échelle. Comment améliorer le caféier pour la résistance aux parasites ? C'est la voie génétique qui a été privilégiée depuis une cinquantaine d'années, avec pour objectif l'obtention de variétés de caféiers résistantes et conservant une production élevée, ainsi qu'une bonne qualité à la tasse (Van der Vossen, 2001). Comme précisé plus haut, l'espèce de caféier *C. arabica* se singularise des autres

espèces du genre *Coffea* par son organisation génomique et son mode de spéciation. *C. arabica* est la seule espèce autogame tétraploïde ($2n = 4x = 44$ chromosomes), les autres espèces étant diploïdes et allogames. Une faible variabilité génétique a été observée au sein de l'espèce *C. arabica* (Lashermes *et al.*, 2000a ; Moncada et McCouch, 2004) et a été attribuée à ses caractéristiques biologiques particulières. Associée à la polyploïdie unique de *C. arabica*, elle limite particulièrement l'amélioration génétique de l'espèce. Les croisements interspécifiques sont cependant possibles, l'autogamie n'étant pas totalement stricte chez *C. arabica*. Il a ainsi été fait largement profit, dans les programmes de sélection, de l'Hybride de Timor, une variété tétraploïde résultant d'une hybridation naturelle de *C. arabica* avec *C. canephora*. Le passage par des hybrides interspécifiques triploïdes peut aussi être utilisé avec succès pour transférer des gènes d'intérêt des espèces diploïdes vers *C. arabica* (Herrera *et al.*, 2004).

Concernant la résistance aux parasites, neuf facteurs de résistance à la rouille (Rodrigues *et al.*, 1975 ; Bettencourt et Rodrigues, 1988) et un gène de résistance majeur (*Mex-1*) à l'espèce de nématode *M. exigua* (Noir *et al.*, 2003) ont été génétiquement caractérisés à ce jour chez les caféiers. Malheureusement, l'introduction de facteurs de résistance à partir des espèces apparentées s'accompagne généralement de facteurs génétiques défavorables à la qualité (Bertrand *et al.*, 2003), plus de 25% du matériel génétique de l'espèce diploïde pouvant être transféré vers *C. arabica* (Lashermes *et al.*, 2000b).

En parallèle des études visant à l'amélioration des stratégies d'introgession, l'identification des gènes associés à des caractères d'intérêt agronomique est une des priorités de recherche pour l'amélioration génétique de *C. arabica* (Van der Vossen, 2001). Si le développement de marqueurs moléculaires pour optimiser la sélection a déjà été entrepris (Combes *et al.*, 2000), en revanche très peu de travaux ont été menés sur le clonage de gènes d'intérêt, et leur expression (Hatanaka *et al.*, 1999 ; Marraccini *et al.*, 2001 ; 2005)⁹. De plus, il nous semble essentiel d'acquérir des informations sur le fonctionnement de ces gènes dans le contexte de polyploïdie de *C. arabica*, la duplication de l'information génétique pouvant conduire à la modulation de l'expression des gènes, voire à son extinction (Adams and Wendel, 2005).

Nos travaux de recherches se sont focalisés sur l'identification et l'analyse fonctionnelle de gènes impliqués dans la résistance du caféier (*C. arabica*) à *H. vastatrix*. Au début de nos travaux (2000), le choix de l'interaction *C. arabica* / *H. vastatrix* comme modèle

⁹ A titre d'information, seulement quelques gènes clonés étaient disponibles dans Genbank jusqu'en 2004.

biologique s'est imposé car la résistance à *H. vastatrix* avait été bien étudiée aux plans cytologique et ultrastructural (Silva *et al.* 1999 ; 2002). Une étude comparative du déroulement du cycle infectieux en situation compatible et incompatible a permis de préciser la chronologie des événements conduisant à l'établissement de la résistance (Silva *et al.* 1999 ; 2002 ; Guimarrães, 2004 ; Ganesh *et al.*, 2006). La résistance du caféier à *H. vastatrix* s'exprime par une HR (Fig. 2) et son phénotype a été bien décrit au plan cytologique (Silva *et al.* 2002). Sur la base de ces données, l'analyse des réponses induites chez la plante a été abordée au niveau moléculaire. En particulier, les observations cytologiques ont fourni des indications essentielles pour le choix des temps de construction de banques d'ADNc et d'étude d'expression des gènes.

Deux variétés ont été choisies sur la base des phénotypes de résistance décrits : la variété S4Agaro (facteurs de résistance SH4,SH5) et la variété Caturra (SH5). Dans la plupart des interactions plante/rouille étudiées, la résistance de la plante liée aux gènes *R* s'exprime après la différenciation des structures d'infection intracellulaires (haustoria) chez le parasite (Heath, 1997). Il vient d'être récemment montré chez la rouille du lin, que l'expression des gènes d'avirulence de *Melampsora lini* se produit dans les haustoria, et que les protéines Avr sont transportées dans les cellules hôtes infectées où elles déclenchent la HR (Catanzariti *et al.*, 2006). Chez le caféier, la résistance post-haustoriale est observée dans l'interaction incompatible S4Agaro/race II (Silva *et al.*, 2002), mais pas dans l'interaction incompatible Caturra/race VI où la croissance d'*H. vastatrix* est stoppée peu après la pénétration du champignon dans la cavité sous-stomatique, sans formation d'haustorium (Guerra-Guimarrães, 2004) (Fig. 3). Ce phénotype de résistance pré-haustorial se rapproche de ce qui est classiquement décrit dans les interactions non-hôte chez les rouilles (Heath, 1997). Il est possible que les mécanismes de résistance du caféier à la rouille soient différents selon les gènes de résistance considérés. Le choix du couple Caturra/race VI comme modèle d'étude de la résistance semble très pertinent, les événements mis en jeu étant déclenchés suffisamment tôt pour empêcher la différenciation de structures d'infection intracellulaires par le parasite.

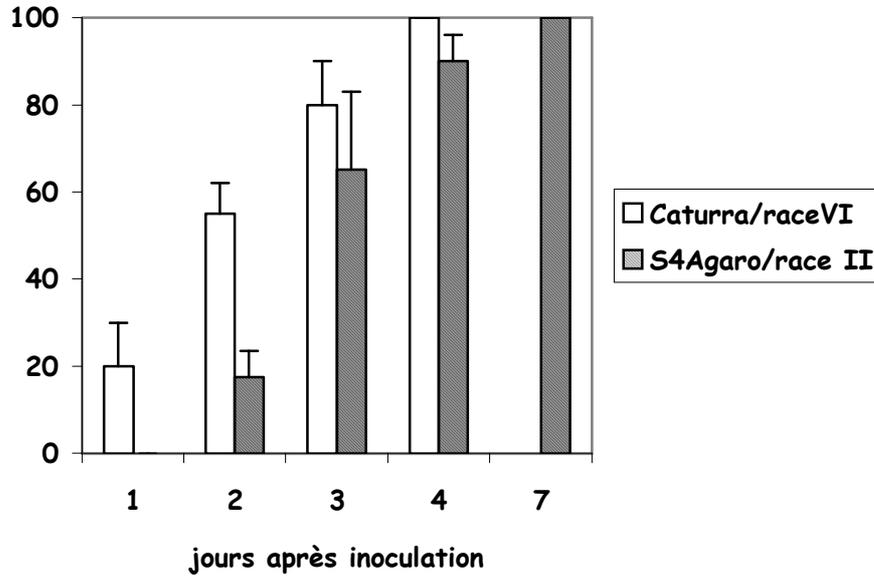


Fig. 2. Cinétique des mortalités cellulaires dans l'interaction incompatible *C. arabica* / *H. vastatrix* (d'après Silva *et al.*, 2002 et Guerra-Guimarães, 2004).

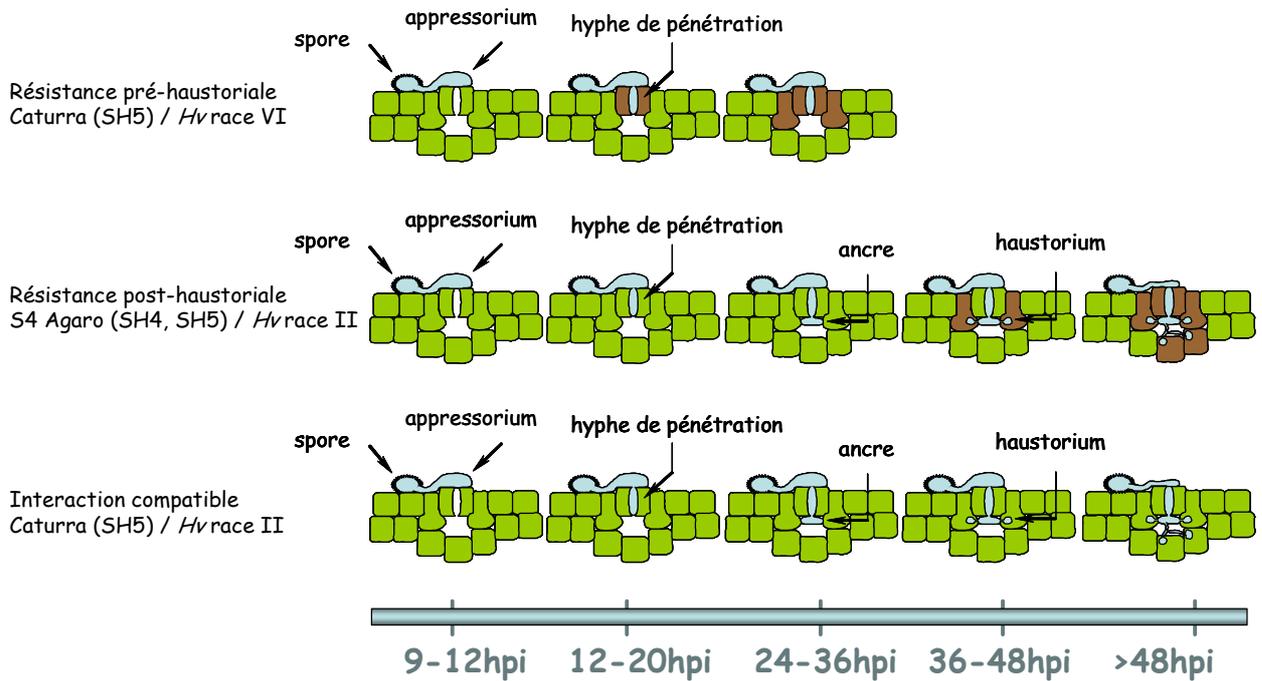


Fig. 3. Croissance d'*H. vastatrix* dans les feuilles de caféier (en marron : cellules végétales présentant une HR) (schéma réalisé à partir des données de Silva *et al.*, 1999, 2002 ; Guerra-Guimarães, 2004).

Les travaux de recherche développés dans cette partie ont été conduits en collaboration étroite avec le Centre international sur les rouilles du caféier (CIFC, Portugal).

Notamment, nous avons codirigé les travaux de thèse de Mlle P. Santos (2002-2005), en formation plusieurs mois par an à l'IRD de Montpellier. Des collaborations ont également été développées dans le cadre d'un contrat Agropolis, avec M. Ganesh D., (Central Coffee Research Institute, Karnataka, Inde), en accueil durant 8 mois en 2004. Ces travaux ont également fait l'objet d'un DEA (C. Agostini, 2000), d'un DESS (X. Argout, 2003) et de plusieurs stages de Maîtrise et Licence Pro. A l'heure actuelle, les résultats sont parus sous forme de 3 publications dans des revues internationales, 3 chapitres d'ouvrage et 5 communications. Par ailleurs, nous avons été associés à 2 publications de revue sur le caféier.

3.4. Résultats acquis

3.4.1. Identification de gènes de caféier induits lors de la résistance à *H. vastatrix*

Afin d'identifier des gènes impliqués dans la résistance spécifique du caféier à *H. vastatrix*, un catalogue des gènes activés spécifiquement au cours de la HR a été établi. L'approche méthodologique a fait appel à la construction de banques d'ADNc soustractives et au séquençage systématique d'étiquettes de gènes (ESTs) exprimés lors de la résistance spécifique (Fernandez *et al.*, 2001 [A30]), puis à l'étude des profils d'expression temporelle et spatiale de ces gènes dans différentes conditions (interactions biotiques, stress, stimulations abiotiques) (Fernandez *et al.*, 2004 [A18] ; thèse de P. Santos, 2005).

Une bonne conservation entre les composants de la résistance aux parasites chez le caféier et les plantes modèles a été révélée par l'analyse bioinformatique des ESTs (Fernandez *et al.*, 2004 [A18]). Des gènes présentant un profil d'expression spécifique de la réaction de résistance ont été identifiés par screening différentiel. Ces gènes présentent des homologies avec des gènes codant des protéines pouvant être impliquées dans des fonctions de signalisation de la résistance tels qu'une LRR récepteur kinase, des facteurs de transcription de type WRKY et AP2, les protéines NDR1 et DND1 (régulateurs de la résistance chez *A. thaliana*), un cytochrome P450, une protéine de choc thermique (HSP70), une SA-glucosyltransférase et, enfin, une protéine de fonction inconnue (clone R111) (Fernandez *et al.*, 2004 [A18]). Pour 3 de ces gènes (*CaWRKY1*, *CaNDR1* et *CaR111*), leur expression a été ensuite validée par RT-PCR quantitative en temps réel (Ganesh *et al.*, 2004 [A31], 2006 [A19]). Par ailleurs, sur la base de leur similarité avec des séquences connues pour intervenir dans les interactions plante / pathogènes, une série de gènes a été choisie parmi les ESTs pour étudier leur expression par RT-PCR semi-quantitative. Plusieurs d'entre eux ont présenté une induction suite à l'infection par *H. vastatrix*, notamment une EST ayant des homologies avec un gène *R* (Silva *et al.*, 2006 [A25]).

3.4.2. Cinétique/dynamique des interactions caféier / *H. vastatrix*

Afin d'analyser la dynamique de la résistance du caféier à *H. vastatrix*, l'expression des gènes a été comparée aux données cytologiques au cours de cinétiques d'infection de la plante (Fig.). Quelle que soit la variété utilisée et l'interaction étudiée (compatible, incompatible), l'activation de gènes potentiellement associés à la défense a été détectée à des stades précoces de l'infection (Fernandez *et al.*, 2004 [A18]; thèse de P. Santos, 2005 ; Ganesh *et al.*, 2006 [A19]), suggérant que la plante réagit à la pénétration des stomates par les hyphes d'*H. vastatrix*, indistinctement de l'avirulence ou de la virulence du parasite.

Concernant la résistance, l'activation spécifique, ou plus importante, de certains gènes a été observée entre les stades de la pénétration d'*H. vastatrix* par les stomates et celui de la formation des haustoria, selon la variété utilisée (Fernandez *et al.*, 2004 [A18]; Ganesh *et al.*, 2006 [A19]). Au niveau cytologique, aucune modification structurale de la plante n'est encore visible à ces stades (Silva *et al.*, 2002 ; Guerra-Guimarães, 2004). Ces résultats suggèrent que la reconnaissance du parasite avirulent par la plante pourrait avoir lieu avant la formation des haustoria, peut-être au moment où les hyphes d'*H. vastatrix* sont en contact étroit avec les cellules de garde de l'hôte. Pour corroborer cette hypothèse, il serait intéressant d'avoir accès à un microscope associé à un système de microdissection par laser afin d'isoler spécifiquement les cellules végétales en contact avec les hyphes infectieuses pour étudier l'expression des gènes dans ces cellules.

3.4.3. Caractérisation du gène *CaWRKY1*

Nos travaux se sont focalisés sur le gène de caféier *CaWRKY1* dont la séquence présente des similarités avec un facteur de transcription de type WRKY. Ces facteurs de transcription constituent une famille de protéines spécifique des plantes (75 membres sont dénombrés chez *A. thaliana*) et de quelques eucaryotes non-photosynthétiques (Eugelm *et al.*, 2000 ; Ülker & Somssich, 2004 ; Zhang & Wang, 2005). Des travaux récents décrivent leur implication dans les réponses de défense des plantes (Chen & Chen, 2002 ; Deslandes *et al.*, 2002 ; Dong *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2005 ; Menke *et al.*, 2005)¹⁰. Concernant *CaWRKY1*, son activation précoce dans l'interaction incompatible en fait un candidat de choix pour une étude de son rôle dans l'expression de la résistance chez le caféier.

Caractérisation des gènes CaWRKY1a et CaWRKY1b :

Le clonage de l'ADNc complet et des séquences génomiques correspondantes a révélé la présence d'au moins deux gènes (*CaWRKY1a* et *CaWRKY1b*) associés à l'EST *CaWRKY1* chez *C. arabica*. Les gènes ne présentent que 95% d'identité de séquence et

diffèrent par des insertions/délétions dans la région 5'UTR et les introns, ainsi que par de nombreuses mutations ponctuelles dans les régions codantes (Petitot *et al.*, 2006 [A35]). Les protéines putatives CaWRKY1a et CaWRKY1b (573 et 572 aa) possèdent les caractéristiques structurales (domaine WRKY, Leucine zipper, signal de localisation nucléaire) des facteurs de transcription de la famille WRKY d'*A. thaliana* (Eugelm *et al.*, 2000).

Parentés phylogénétiques des gènes CaWRKY1a et CaWRKY1b :

L'espèce *C. arabica* résulterait de l'hybridation entre deux espèces de caféier diploïdes, *C. eugenoides*, d'une part, et *C. canephora* ou *C. congensis*, d'autre part (Raina *et al.*, 1998 ; Lashermes *et al.* 1999). Afin de vérifier la relation génétique entre les deux gènes *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* (allèles, paralogues ou gènes homéologues ?), le clonage et le séquençage des orthologues du gène *CaWRKY1* chez 6 espèces diploïdes de caféier ont été réalisés. L'analyse phylogénétique a montré que les séquences de *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* sont fortement apparentées à celles clonées chez *C. canephora* et *C. congensis* (pour *CaWRKY1a*) et *C. eugenoides* (pour *CaWRKY1b*) (Fig. 4 et Petitot *et al.*, 2006 [A35]). Ce résultat suggère que *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* sont deux copies homéologues du gène *CaWRKY1* chez *C. arabica*, chacune d'elles appartenant à un des deux anciens sous-génomes diploïdes de *C. arabica*.

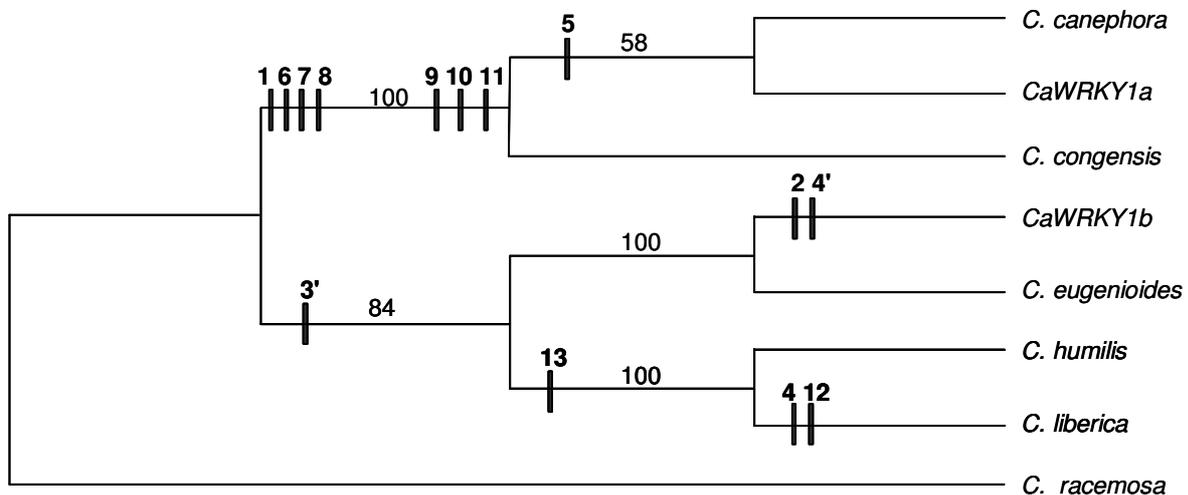


Fig. 4. Arbre phylogénétique (parcimonie maximum) des gènes *WRKY1* chez différentes espèces de caféier. Les chiffres indiqués sur les branches sont les valeurs de bootstrap obtenues après 100 ré-échantillonnages. Les barres verticales représentent les mutations de type "indel" présentes dans les séquences mais non prises en compte dans l'analyse et la construction de l'arbre.

¹⁰ Une analyse bibliographique des gènes *WRKY* est développée dans le projet de recherches (p 48).

Régulation des gènes *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* :

Pour vérifier la transcription de chacun des gènes *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* et évaluer leur activation respective dans différentes situations, les niveaux de transcrits des deux gènes ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel (Fig. 5 et Petitot *et al.*, 2006 [A35]). Les 2 gènes sont régulés de manière similaire en conditions de stress biotique (interaction avec *H. vastatrix*) et abiotique (blessure, induction hormonale), ce qui semble exclure l'hypothèse d'une divergence fonctionnelle des copies homéologues.

Les promoteurs des deux gènes ont été isolés par marche sur le gène et les éléments *cis*-régulateurs ont été identifiés par homologie de séquence. Les promoteurs *pCaWRKY1a* et *pCaWRKY1b* présentent 76% d'homologie, différant notamment par des insertions et la présence différentielle de boîtes W (cibles des facteurs WRKY) et d'éléments de réponse au SA. L'analyse de la fonctionnalité de ces promoteurs en système d'expression transitoire (hétérologue-Tabac et homologue) est en cours.

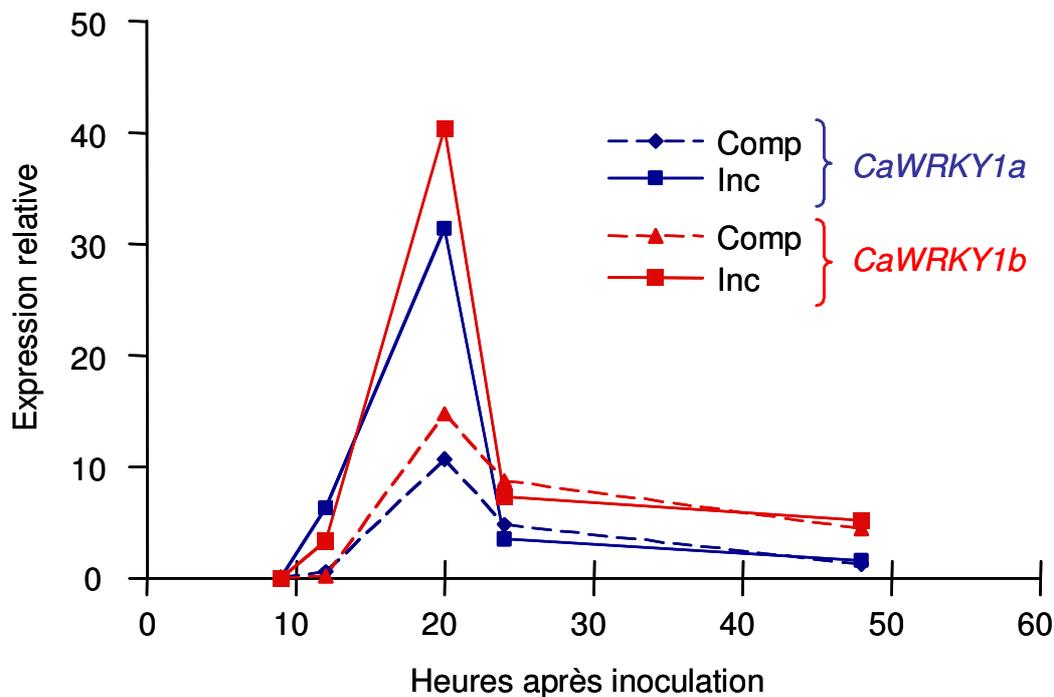


Fig. 5. Cinétique d'expression des gènes *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* au cours d'une interaction compatible ou incompatible entre *C. arabica* et *H. vastatrix*.

3.5. Conclusions et perspectives

Dans le cadre de ce second axe de recherches, nos travaux se sont focalisés sur l'identification de gènes de la plante-hôte impliqués dans la résistance aux agents

pathogènes. Les résultats décrits ici ont permis d'identifier des pistes intéressantes à suivre dans le futur.

Chez le caféier, ces travaux constituent la première étude, au niveau moléculaire, des réponses physiologiques de la plante à des stress biotiques. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour approfondir notre compréhension des mécanismes qui participent à l'induction des réactions de défense du caféier à *H. vastatrix*. En effet, grâce à ce travail, nous avons pu établir les cinétiques de réponses de la plante au parasite et identifier des gènes rapidement activés dans la HR. Plusieurs de ces gènes pourraient être étudiés pour établir leur fonction dans la résistance du caféier. Le gène *CaWRKY1*, en tant que facteur de transcription permettant d'activer les réactions de défense ; le gène *CaNDR1* ainsi que le gène codant une LRR receptor-like kinase (*CaLRR-RLK1*) en tant qu'éléments potentiels des voies de signalisation de la résistance ; enfin, le gène *CaR111* induit précocement et spécifiquement dans la HR, mériterait aussi notre attention. Le développement récent d'outils génétiques et génomiques chez *C. arabica* et *C. canephora* permettent désormais d'envisager des approches de génomique fonctionnelle chez le caféier. En collaboration avec l'Embrapa et l'IAC au Brésil qui disposent de plus de 200 000 ESTs de *C. arabica*, l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la résistance sera entreprise sur la base de leur homologie avec des gènes identifiés chez les plantes modèles. Ces activités sont décrites dans le projet de recherches que nous proposons ci-après (p 48 – 58).

D'autres perspectives peuvent découler de nos travaux et pourraient être envisagées dans le cadre de collaborations extérieures.

Par exemple, concernant *H. vastatrix*, nous avons mis en évidence des réponses différentielles de la plante qui suggèrent une reconnaissance précoce du parasite avirulent. Très peu de données sont disponibles sur la physiologie moléculaire des interactions plante/rouille, essentiellement parce qu'il n'existe pas de tels parasites pour *A. thaliana*. Chez la rouille du lin, il a été montré que les gènes *avr* de *M. lini* sont principalement exprimés dans l'haustorium, d'où la(les) protéine(s) Avr est(sont) exportée(s) vers les cellules végétales infectées. Cette découverte a été mise à profit pour cloner plusieurs facteurs d'avirulence à partir de banques d'ADNc réalisées à partir d'haustoria purifiés, en recherchant *in silico* les protéines présentant un peptide signal d'exportation extracellulaire (Catanzariti *et al.*, 2006). Une telle approche pourrait être initiée chez *H. vastatrix* à un stade plus précoce, puisque dans l'interaction que nous avons étudiée la HR est exprimée avant la formation d'haustorium. La recherche de protéines excrétées par le champignon permettrait de vérifier à quelle étape la reconnaissance spécifique du parasite a lieu. Au plan fondamental, l'identification de gènes *avr* chez *H. vastatrix* apporterait une foule de perspectives intéressantes. Sur le plan appliqué, le clonage de gènes *avr* permettrait aussi

de disposer d'un système d'élicitation artificiel des réactions de défense, ainsi que d'outils de caractérisation des races du parasite, qui repose toujours sur des tests de pouvoir pathogène.

D'autres perspectives pourraient aussi être envisagées à partir de nos travaux, mais qui ne dépendent plus du domaine de la phytopathologie. Les ESTs que nous avons produites sont les premières ESTs de *C. arabica* à avoir été déposées dans une banque publique de gènes. Très récemment, 40 000 ESTs de *C. canephora* ont aussi été rendues publiques (Lin *et al.*, 1995). La disponibilité de nombreux gènes de *C. arabica* et de *C. canephora* offre la possibilité d'affiner les relations phylogénétiques au sein du complexe d'espèces des caféiers, par exemple. Les résultats obtenus avec le gène *CaWRKY1* ont montré que le gène *CaWRKY1a* était proche de celui des espèces actuelles de *C. canephora* et *C. congensis*. La séquence protéique déduite de *CaWRKY1a* est totalement identique à celle de *C. congensis*, alors que le gène présente une insertion dans le 5'UTR caractéristique de *C. canephora*. L'origine phylogénétique de *C. arabica* est controversée, les géniteurs présumés de l'espèce ayant été identifiés comme *C. eugenioides* et *C. congensis* par Raina *et al.* (1998) et comme *C. eugenioides* et *C. canephora* par Lashermes *et al.* (1999). L'espèce *C. canephora* étant connue pour être très diversifiée, l'analyse du gène *WRKY1* de génotypes provenant de la zone géographique d'origine de *C. arabica* (Ouganda, par exemple) permettrait de lever une telle ambiguïté. Cette analyse pourrait être étendue à d'autres gènes afin de préciser la spéciation de *C. arabica*.

Une autre voie de recherche qui pourrait être entreprise serait l'étude des gènes et de la régulation de leur expression dans le contexte allopolyploïde de *C. arabica*, qui permettrait de mettre en évidence d'éventuels mécanismes liés à un contrôle des allèles homéologues, et à leur évolution. Nous n'avons pas observé de différence dans l'expression des copies homéologues du gène *CaWRKY1*. La spéciation récente de *C. arabica* pourrait expliquer l'absence de divergence fonctionnelle des gènes dupliqués. Il serait intéressant de vérifier ce résultat en choisissant, par exemple, quelques gènes impliqués dans des fonctions très différentes et *a priori* soumis à des pressions de sélection différentes (gènes essentiels du métabolisme *versus* gènes de résistance, par exemple). Une telle étude apporterait certainement des données intéressantes pour la compréhension de l'évolution des allèles homéologues chez *C. arabica*, et, par extension dans les espèces allopolyploïdes.

**PROJET DE RECHERCHES :
PHYSIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA RÉSISTANCE DU CAFÉIER AUX PARASITES**

1. Introduction

Ce projet de recherches se situe dans la continuité des travaux menés jusqu'à présent sur la résistance du caféier à *H. vastatrix*, et propose de comprendre et d'étudier le rôle et le fonctionnement de gènes de caféier dans la résistance aux parasites. Il s'agira, pour une meilleure compréhension de l'induction des réponses de défense du caféier, d'identifier des composants régulateurs de ces réponses et d'établir les voies de régulation de l'expression des gènes de défense. L'accent sera mis sur la caractérisation fonctionnelle des gènes identifiés précédemment, et plus particulièrement ceux codant des facteurs de transcription WRKY. Parmi les gènes régulateurs, les facteurs de transcription sont en effet particulièrement intéressants, car ils coordonnent l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes d'une voie métabolique et activent des programmes cellulaires en réponse à des signaux internes ou provenant de l'environnement (Singh *et al.*, 2002). Dans les interactions plantes / parasites, la régulation transcriptionnelle de centaines de gènes de la plante hôte joue un rôle primordial dans l'induction des réactions de défenses (Nimchuk *et al.*, 2003). Des facteurs de transcription, appartenant à la plupart des familles connues chez les plantes, sont directement impliqués dans la régulation de l'activité de gènes liés à l'expression de la résistance (Maleck *et al.*, 2000 ; Chen and Chen, 2002 ; Kalde *et al.*, 2003 ; Ülker et Somssich, 2004).

Nous présentons ici les activités de recherche envisagées pour les années à venir, en détaillant les objectifs, les approches expérimentales et les différentes collaborations envisagées.

Le projet de recherches que nous proposons sera réalisé au sein de l'UMR « Résistance des Plantes aux Bioagresseurs », dirigée par M. Michel Nicole. Quatre personnes seront directement impliquées dans ce projet : Mlle Anne-Sophie Petitot (IR, recrutée en 2002), M. Daniel Ramiro (en 1^{ère} année de thèse), Mlle Carla Barsalobres (en 1^{ère} année de thèse au Brésil) et moi-même. Ce projet sera conduit en étroite association avec celui que nous supervisons sur la résistance du caféier aux nématodes du genre *Meloidogyne* et qui implique Mlle Anne-Claire Lecouls (CR2, recrutée en 2003) et Mme Erika Albuquerque Barros (chercheur à l'EMBRAPA, Brésil, en 1^{ère} année de thèse). Par ailleurs, nos activités sont développées conjointement aux études de clonage et d'identification des gènes *R*, d'évaluation des ressources génétiques, et de caractérisation des changements métaboliques et moléculaires liés à l'introgession de gènes issus d'espèces apparentées, qui sont effectuées sur les caféiers dans l'UMR « Résistance des Plantes aux Bioagresseurs » et qui impliquent des chercheurs de l'IRD et du CIRAD.

2. Description des activités

Nos travaux s'orienteront autour de deux principaux axes de recherche, l'identification de gènes impliqués dans la résistance spécifique à *H. vastatrix*, d'une part, et la caractérisation fonctionnelle de ces gènes, d'autre part.

L'analyse fonctionnelle des gènes caractérisés sera entreprise par transformation génétique chez des plantes modèles, en attendant de disposer d'un système de transformation génétique homologue (en cours de mise au point au laboratoire).

Une attention particulière sera portée à la caractérisation des gènes chez le caféier, l'espèce *C. arabica* étant allopolyploïde. L'identification des copies homéologues pour chacun des gènes retenus devra être entreprise, ainsi que la recherche d'une éventuelle divergence fonctionnelle des copies qui aurait pu avoir lieu au cours de l'évolution.

2.1. Identification de gènes impliqués dans la résistance spécifique du caféier aux parasites

(travail de thèse de M. Daniel Ramiro)

L'identification des gènes impliqués dans la résistance du caféier aux ravageurs se fera à deux niveaux, le premier par la recherche de gènes candidats, le second à travers l'étude de la régulation de l'expression de gènes.

2.1.1. Recherche de gènes candidats

L'étude de « gènes candidats », impliqués dans la résistance, et plus particulièrement des gènes régulateurs, choisis sur la base de leur homologie avec des gènes connus chez les espèces modèles sera entreprise afin de découvrir et de caractériser de nouveaux gènes chez le caféier. Des gènes codant des protéines impliquées dans les voies de signalisation de la résistance (Recepteurs kinase, MAP kinases, peroxydases, etc...), les gènes régulateurs NPR1, RAR1, SGT1, EDS1, PAD3, PAD4 identifiés chez *A. thaliana*, ainsi que des facteurs de transcription (de type WRKY, bZIP) connus pour activer l'expression de nombreux gènes de défense seront recherchés par homologies de séquences avec les ESTs de caféier disponibles (Vieira et Andrade, 2005 ; collaboration Embrapa et IAC, Brésil).

Concernant les gènes codant des facteurs de transcription de la famille WRKY, les membres de cette famille ont été systématiquement recherchés parmi les ESTs disponibles (Vieira et Andrade, 2005 ; Lin *et al.*, 2005), et annotés par rapport à la classification existante chez *A. thaliana* (Eulgem *et al.*, 2000) en fonction de la similitude de leurs séquences d'acides aminés du domaine WRKY (Fernandez *et al.*, 2006 [A33]).

Les ESTs seront ensuite regroupés sur la base de leur expression dans les différentes conditions physiologiques qui ont été utilisées pour la fabrication des banques d'ADNc (Vieira et Andrade, 2005 ; Lin *et al.*, 2005). Cette étape nécessitera une analyse

bibliographique poussée pour le choix des gènes, ainsi qu'une analyse bioinformatique approfondie pour identifier les séquences homologues, ainsi que leur(s) éventuel(s) allèle(s) homologue(s) chez *C. arabica*. Des oligonucléotides spécifiques de chacun des gènes devront être définis en tenant compte de ces variations éventuelles.

Les gènes présentant *in silico* une expression préférentielle dans les banques représentatives d'une réponse à un parasite ou à un traitement inducteur des réactions de défense seront sélectionnés pour une étude de leur expression lors des réponses du caféier aux parasites ou à des traitements hormonaux.

2.1.2. Etude de la régulation de l'expression des gènes

L'expression des gènes retenus sera étudiée dans le cadre de cinétiques d'infections du caféier avec *H. vastatrix* dans différentes situations de résistance / sensibilité, en utilisant des variétés résistantes à différentes races d'*H. vastatrix*, et prioritairement des variétés de caféier cultivées au Brésil. En particulier, le choix des variétés sera étendu à la variété Brésilienne introgressée Icatu qui présente une résistance quantitative à la rouille (Fig. 6 et Kushalappa and Eskes, 1989). Les essais d'inoculation inclueront des plantes témoins qui permettront la réalisation d'un cycle biologique complet de la rouille (4-6 semaines, env.) et qui serviront à mesurer des paramètres de résistance quantitative, comme le délai d'apparition des symptômes, le nombre de spores produites, la taille des lésions etc...

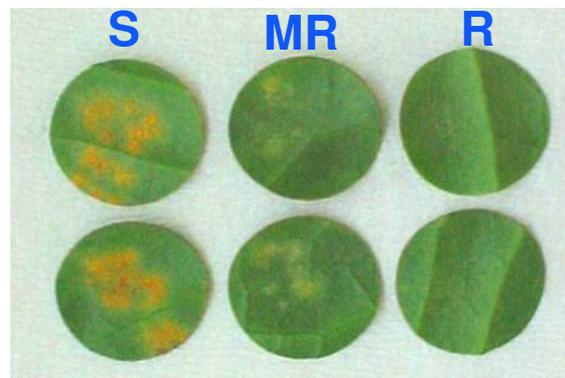


Fig. 6. Sporulation et symptômes de rouille sur trois variétés de caféier, sensible (S), moyennement résistante (MR) et résistante (R) à la race II d'*H. vastatrix* (D. Ramiro, com. pers.).

La technique d'inoculation sur disques foliaires (Eskes, 1982) a été validée pour l'étude de l'expression des gènes de caféier (Ramiro *et al.*, 2006 [A32]) et sera utilisée. Les niveaux de transcrits des gènes seront quantifiés par PCR quantitative en temps réel. En parallèle, des analyses histologiques permettront de vérifier le stade d'infection du parasite.

Il sera également opportun d'évaluer l'expression des gènes en réponse à la blessure ainsi qu'à des stimulations hormonales (acide salicylique, jasmonate). Les données obtenues permettront d'évaluer l'implication des gènes candidats dans la résistance, et de choisir un ou plusieurs candidats pour une analyse fonctionnelle.

2.2. Caractérisation fonctionnelle des gènes

Nos précédents travaux ont permis d'isoler une série de gènes activés lors de l'interaction du caféier avec *H. vastatrix* (Fernandez *et al.*, 2004 [A18]). Nos activités futures se centreront sur la caractérisation fonctionnelle de plusieurs d'entre eux afin d'évaluer leur rôle dans l'interaction caféier/*H. vastatrix*. La démarche à suivre sera la suivante : dans une première étape, nous chercherons à valider le rôle de ces gènes dans la résistance des plantes aux agents pathogènes en utilisant des mutants correspondant aux orthologues des gènes de caféier chez *A. thaliana* ou *Oryza sativa*, selon la disponibilité. La méthodologie fera aussi appel à la construction de mutants dominants négatifs afin d'éviter des redondances fonctionnelles entre protéines de la même famille (particulièrement dans le cas des protéines WRKY et des récepteurs kinases). La surexpression du gène de caféier chez *A. thaliana* sera aussi réalisée et l'effet sur la résistance de la plante sera évalué. Dans un deuxième temps, l'analyse fonctionnelle des gènes dont le rôle dans la résistance aura été validé chez les plantes modèles sera entreprise chez le caféier, afin de déterminer l'activité biochimique de la protéine codée et d'identifier sa fonction dans l'induction des réactions de défense du caféier.

Parmi les gènes candidats, nous avons pour le moment porté notre choix sur les gènes *CaWRKY1*, *CaR111* et *CaNDR1* ainsi que sur le gène codant une LRR receptor-like kinase (*CaLRR-RLK1*). Dans ce document, nous illustrerons les activités liées à cet axe de recherches par l'analyse du gène *CaWRKY1*. Nous ne décrivons que brièvement les autres, uniquement afin d'expliquer les raisons de notre choix.

2.2.1. Rôle de *CaWRKY1* dans la résistance

Le gène *CaWRKY1* présente de fortes similarités de séquence avec 3 gènes d' *A. thaliana* codant un facteur de transcription de type WRKY, *AtWRKY6*, *AtWRKY31*, et *AtWRKY42*. Les données d'expression que nous avons obtenues chez *CaWRKY1* sont plus proches de celles décrites chez *AtWRKY6* par Dong *et al.* (2003), à savoir une activation par l'infection avec un parasite ou par traitement au SA, *AtWRKY31* n'étant induit que par l'infection et le gène *AtWRKY42* n'étant induit par aucun des traitements testés. Par ailleurs, *CaWRKY1* est aussi fortement activé par la blessure et dans les tissus sénescents comme *AtWRKY6* (Robatzek et Somssich, 2001).

Les facteurs de transcription de la famille WRKY participent à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus physiologiques, et plus particulièrement ceux liés au développement des plantes (germination, sénescence), et à l'activation des réactions de défense des plantes aux parasites (pour revue, Ülker et Somssich, 2004). Le mode de fonctionnement des facteurs WRKY et la mise en évidence de leur rôle direct dans l'induction des réactions de défense font actuellement l'objet de nombreuses publications scientifiques.

La transcription d'un grand nombre de gènes *WRKY* est rapidement induite suite à une infection parasitaire et/ou après traitement par l'acide salicylique (Dong *et al.*, 2003; Kalde *et al.*, 2003), ainsi que par des stress abiotiques tels que la blessure (Eulgem *et al.*, 2000). Les facteurs de transcription WRKY reconnaissent spécifiquement dans les promoteurs de leurs gènes cibles des *cis*-éléments de séquence (C/T)TGAC(T/C), appelés boîtes W (Rushton et Somssich, 1998 ; Kalde *et al.*, 2003). Les gènes *WRKY* eux-mêmes contiennent des boîtes W dans leurs promoteurs et sont soumis à autorégulation négative (Robatzek et Somssich, 2001, 2002 ; Chen et Chen, 2002 ; Turk *et al.*, 2004). L'autorégulation des gènes *WRKY* empêcherait une trop forte accumulation de protéines WRKY dans le noyau et une activation prolongée des gènes cibles. Des essais d'immunoprécipitation de chromatine ont révélé que des facteurs WRKY occupent en permanence les éléments W des promoteurs, même en l'absence de stimulation des cellules végétales (Turk *et al.*, 2004). L'activation de facteurs WRKY par des MAP kinases induites par la reconnaissance d'un agent pathogène, ou d'un éliciteur bactérien (flagelline *via* le récepteur FLS2) a été montrée chez *A. thaliana* et le tabac (Asai *et al.*, 2002 ; Menke *et al.*, 2005). Chez le tabac, la phosphorylation directe de WRKY1 par une MAP kinase a été démontrée (Menke *et al.*, 2005). Ülker et Somssich (2004) ont proposé un modèle de régulation transcriptionnelle séquentiel, différenciant l'activation immédiate des gènes WRKY *via* une cascade de MAP kinases, suite à un stimulus, d'une activation secondaire liée au recrutement des protéines WRKY néoformées (Fig. 7).

Concernant le rôle des WRKY dans l'induction des défenses, on sait que l'activité transcriptionnelle de plusieurs centaines, voire milliers de gènes de la plante est rapidement modifiée en réponse à l'interaction avec un agent pathogène (Maleck *et al.*, 2000 ; Schenk *et al.*, 2000 ; Reymond, 2001 ; Ronning *et al.*, 2003 ; Tao *et al.*, 2003). Une analyse systématique des gènes qui présentaient une régulation transcriptionnelle commune dans des conditions gouvernant la mise en place de la SAR a montré que ces gènes possédaient dans leurs promoteurs plusieurs motifs consensus de type boîte W (Maleck *et al.*, 2000). Depuis, l'activation directe du gène *NPR1*, régulateur essentiel de la SAR, ainsi que de gènes *PR* (Pathogenesis-related) par des facteurs WRKY a, en effet, été démontrée chez *A.*

thaliana et le persil (Yu *et al.*, 2001 ; Robatzek et Somssich, 2002 ; Chen *et al.*, 2003 ; Turk *et al.*, 2004).

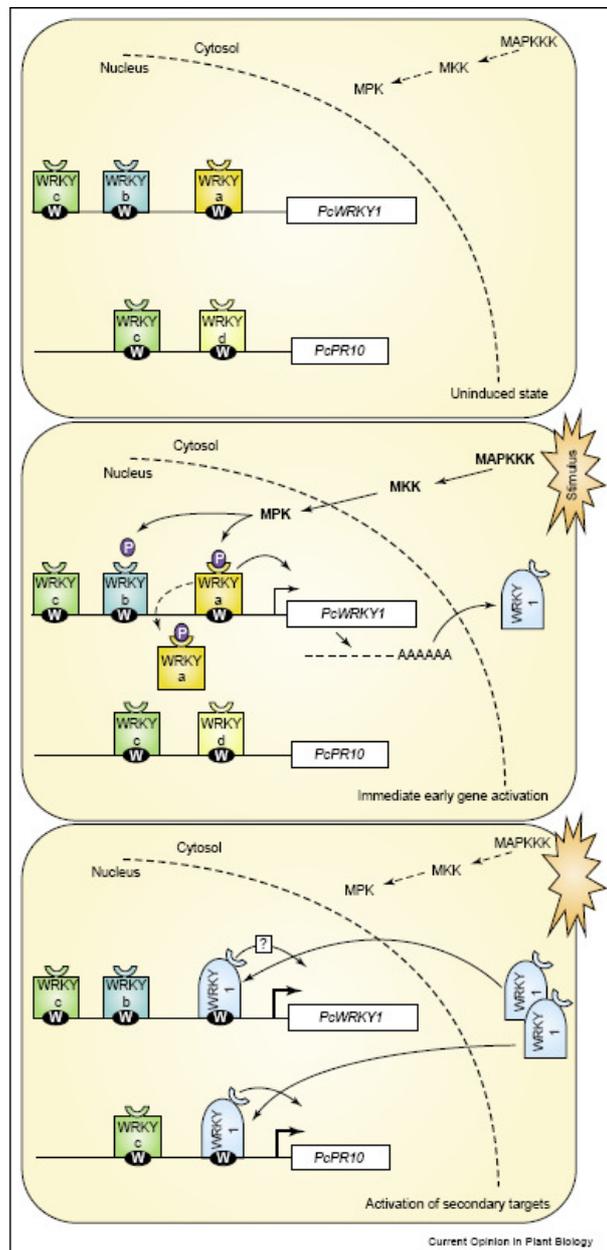


Fig. 7 : Modèle de régulation transcriptionnelle des gènes par les facteurs de transcription WRKY proposé par Ülker et Somssich (2004). Dans les cellules de *Petroselinum crispum* (persil) non induites, les boîtes W des promoteurs des gènes cibles sont déjà liées à des facteurs WRKY qui sont soit inactifs, soit qui participent à la répression de l'activité basale des gènes. Suite à la reconnaissance d'un agent pathogène, une cascade de MAP kinases est rapidement activée et aboutit au transfert d'une protéine kinase dans le noyau de la cellule. L'activité de cette kinase modifie directement certains facteurs WRKY liés aux promoteurs de gènes de réponse rapide, comme *PcWRKY1*, permettant ainsi la dérégulation ou l'activation de l'expression de ces gènes. En conséquence, le niveau cellulaire de la protéine WRKY1 augmente, conduisant à l'autorégulation de *PcWRKY1* et à l'activation de cibles génétiques secondaires telle que *PcPR10*.

Des résultats récents montrent que, selon les voies de signalisation qui sont impliquées, les protéines WRKY peuvent fonctionner comme des activateurs ou comme des répresseurs transcriptionnels des gènes de défense. Par exemple, le facteur WRKY70 active l'expression des gènes liés à la SAR, mais régule négativement celle des gènes normalement induits par le jasmonate (Li et al., 2004 ; 2006). A l'inverse, les trois facteurs WRKY18, WRKY40 et WRKY60 fonctionnent comme des régulateurs négatifs des voies dépendantes du SA, et jouent un rôle positif dans celles dépendantes du jasmonate (Xu et al., 2006).

La caractérisation du gène *RRS1-R* d'*A. thaliana*, qui confère à l'état récessif une résistance à *Ralstonia solanacearum*, soulève aussi de nouvelles questions quant au système d'activation des réponses de la plante aux agents pathogènes (Deslandes et al., 2002 ; 2003). *RRS1-R* code une protéine possédant les motifs structuraux caractéristiques (TIR-NBS-LRR) de protéines R, associés à un domaine WRKY carboxy-terminal (Deslandes et al., 2002). L'interaction physique entre *RRS1-R* et PopP2, protéine d'avirulence de *R. solanacearum* a été démontrée *in vitro*, ainsi que le transfert de *RRS1-R* dans le noyau en présence de PopP2, ce qui suggère un double rôle pour *RRS1-R*, à la fois récepteur et régulateur transcriptionnel (Deslandes et al., 2003). De façon intéressante, le mutant *slh1* (SLH1 chez *A. thaliana* No-0 étant l'homologue de *RRS1-R* chez l'écotype Nd), dont le domaine WRKY a perdu la capacité à se lier à l'ADN, exprime de façon constitutive des gènes de défense, produit un taux élevé de SA et des morts cellulaires de type HR (Noutoshi et al., 2005). Ces résultats suggèrent qu'en l'absence de l'agent pathogène, SLH1/*RRS1-R* agirait, directement ou indirectement, comme répresseur transcriptionnel de la résistance. Sa liaison à PopP2 induirait un changement conformationnel qui permettrait la dérégulation des gènes cibles et l'activation des réactions de défense (Noutoshi et al., 2005).

Concernant *AtWRKY6*, l'orthologue de *CaWRKY1*, ce gène a été étudié pour son implication dans la résistance aux parasites mais aussi dans la sénescence. *AtWRKY6* est fortement exprimé dans les tissus sénescents et en réponse à *P. syringae* et à la flagelline (Robatzek et Somssich, 2001 ; 2002). Des lignées de surexpression d'*AtWRKY6* montrent une accumulation de PR1 et NPR1, mais ne semblent pas présenter une résistance accrue à *P. syringae* ni davantage de morts cellulaires que la plante sauvage. Les deux lignées nulles testées n'ont pas montré de phénotype mutant prononcé, ce qui pourrait s'expliquer par des phénomènes de redondance fonctionnelle (Robatzek et Somssich, 2002). Une des cibles d'*AtWRKY6* identifiée, le récepteur kinase AtSIRK (senescence-induced receptor-like kinase) peut, en effet, être aussi activé par *AtWRKY42*, proche d'*AtWRKY6* (Robatzek et Somssich, 2002). Il est probable, que, comme pour *AtWRKY18*, *AtWRKY40* et *AtWRKY60* (Xu et al., 2006), des interactions fonctionnelles existent entre *AtWRKY6* et d'autres membres phylogénétiquement proches, comme *AtWRKY42* et *AtWRKY31*.

Rôle du gène CaWRKY1 dans la résistance

Afin d'évaluer le rôle éventuel de l'orthologue de *CaWRKY1* dans le mécanisme de résistance d' *A. thaliana* aux parasites, nous proposons d'entreprendre une analyse à l'aide de mutants dominants négatifs pour s'affranchir des phénomènes de redondance fonctionnelle observés. De tels mutants permettent l'expression de protéines qui ont perdu leur fonction (trans-activation de gènes, par exemple dans le cas des facteurs de transcription), mais dont la structure tridimensionnelle est suffisamment conservée pour continuer à occuper leur place originale au sein de complexes protéiques, par exemple, évitant ainsi d'y être remplacée par une protéine fonctionnelle (Shpak *et al.*, 2003). Des gènes mutés, codant une protéine *CaWRKY1* ou *AtWRKY6* modifiée au sein du domaine WRKY de liaison à l'ADN, seront construits, et placés en amont d'un promoteur constitutif fort (*CaMV 35S*) ou inductible (*Gal4*). Après avoir vérifié leur perte de liaison à l'ADN, on évaluera l'effet de la surexpression de ces mutants sur le phénotype de la plante transformée en réponse à la bactérie *P. syringae* ou à un traitement à la flagelline, inducteur de réactions de résistance (Zipfler *et al.*, 2004).

Des mutants d'insertion *Atwrky31* et *42* (orthologues de *CaWRKY1*) qui sont disponibles dans les banques pourront aussi être testés et l'obtention de triple mutants *Atwrky6/31/42* pourra aussi être envisagée.

Régulation du gène CaWRKY1

Si des phénotypes mutants étaient observés, nous entreprendrons alors une caractérisation poussée du gène *CaWRKY1*. La régulation du gène pourra être étudiée par suivi de l'expression d'un gène rapporteur (*gus* ou *gfp*) mis en aval des promoteurs des deux copies homéologues *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b*. Nous vérifierons la spécificité d'expression spatio-temporelle du gène au cours de cinétiques d'infection et après stress abiotiques. A plus long terme, une analyse détaillée des promoteurs pourra être entreprise afin de mettre en évidence les éléments *cis*-régulateurs indispensables à l'activation des gènes pour la mise en place des réactions de défense.

Caractérisation de la fonction biochimique de CaWRKY1

Au niveau protéique, des anticorps polyclonaux permettant la reconnaissance spécifique des protéines *CaWRKY1* seront produits à partir d'une protéine recombinante et on vérifiera la localisation nucléaire de *CaWRKY1* par des expériences de type Western sur des extraits nucléaires purifiés. Dans un deuxième temps, les séquences ADN cibles de *CaWRKY1* seront vérifiées par la technique de gel retard, en utilisant des séquences

oligonucléotidiques consensus des facteurs de transcription WRKY (boite W). Des contacts ont été pris avec I. Somssich (Max Planck Institut, Allemagne) pour une collaboration sur ce point.

Recherche des cibles de CaWRKY1 (Carla Barsalobres)

L'activation directe des gènes *PR1* et *NPR1* par des facteurs WRKY a été montrée chez *A. thaliana* (Yu *et al.*, 2001 ; Robatzek et Somssich, 2002, 2004 ; Chen *et al.*, 2003). A partir des ESTs de caféier homologues disponibles, les séquences promotrices des gènes *PR1* et *NPR1* seront clonées par marche sur le génome, et les éléments *cis*-régulateurs seront identifiés par homologie avec les séquences des banques de données spécialisées (PLACE (Plant Cis Element) e Plant-CARE (Plant Cis-Acting Regulatory Element)). On recherchera en particulier la présence des motifs W. Afin de vérifier l'activation des gènes *PR1* et *NPR1* par la protéine CaWRKY1, des essais de trans-activation pourront alors être entrepris sur protoplastes d'*A. thaliana* par co-transformation du gène *CaWRKY1* avec des constructions portant les promoteurs des gènes cibles en amont du gène *GUS*, tel que décrit par Menke *et al.* (1999).

Les résultats obtenus permettront d'attribuer une fonction biochimique à la protéine CaWRKY1 et un rôle éventuel dans le mécanisme de résistance du caféier aux parasites.

2.2.2. Autres gènes d'intérêt

CaNDR1

Nous avons isolé un gène ayant une forte identité de séquence avec *NDR1* (non-race specific disease resistance gene), un gène de régulation de la voie de signalisation de la HR chez *A. thaliana*. Sa mutation supprime la réponse de résistance conférée par plusieurs gènes *R*, alors que sa surexpression permet la résistance à la bactériose (*P. syringae*) de variétés sensibles d'*A. thaliana* (Century *et al.*, 1997). La fonction biochimique de *NDR1* est encore inconnue, mais sa localisation membranaire suggère que la protéine pourrait interagir avec un produit du parasite (Coppinger *et al.*, 2004). Comme pour *NDR1*, *CaNDR1* est légèrement induit en réponse à l'infection et au SA (Ganesh *et al.*, 2006 [A19]). Pour vérifier la fonction de *CaNDR1* dans la résistance du caféier aux parasites, la complémentation fonctionnelle du mutant *ndr1-1* d'*A. thaliana* pourra être entreprise. Les ADNc homéologues ont été entièrement clonés chez le caféier. Ils seront mis sous contrôle d'un promoteur fort de type 35S, et la construction ainsi obtenue pourra être transférée *via* agro-infection chez le mutant *ndr1-1* d'*A. thaliana*. La réponse des plantes transformées à la bactérie *P. syringae* ou à la flagelline sera ensuite évaluée. Si le gène *CaNDR1* était capable de compléter *ndr1*, une étude plus approfondie du gène et de ses séquences promotrices sera entreprise.

CaR111

Le gène *CaR111* possède des similarités de séquences fortes avec une protéine d' *A. thaliana* de fonction inconnue, dont l'expression est activée en réponse aux stress salins (Gong *et al.*, 2001). On sait que les stress salins sont générateurs d'espèces réactives de l'oxygène et de morts cellulaires comme la HR (Hasegawa *et al.*, 2000). *CaR111* est spécifiquement activé dans l'interaction incompatible caféier/*H. vastatrix* et en réponse au SA et à la blessure (Ganesh *et al.*, 2006 [A19]). Ce gène pourrait donc avoir une fonction intéressante dans la HR du caféier. Des mutants d'insertion existent chez *A. thaliana* pour les orthologues de *CaR111*, et pourraient être testés pour l'altération de leur réponse aux agents pathogènes

CaLRR-RLK1

Les protéines de type receptor-like kinase jouent un rôle essentiel dans la réponse cellulaire aux facteurs extérieurs et aux modifications de l'environnement (Morris and Walker, 2003). Concernant la réponse aux agents pathogènes, le gène de résistance à la bactériose du riz, *Xa21* et le récepteur de la flagelline, *FLS2*, sont des LRR-RLK qui permettent l'activation rapide des défenses de la plante (Song *et al.*, 1995 ; Gomez-Gomez *et al.*, 2000). *CaLRR-RLK1* possède une forte similarité de séquence avec une RLK de riz, du groupe des RLKs de CLAVATA1 d' *A. thaliana* (Diévert, com. pers.; Diévert *et al.*, 2003 ; Diévert et Clark, 2004) et est spécifiquement activé dans l'interaction incompatible caféier/*H. vastatrix* (Fernandez *et al.*, 2004 [A18]). Des mutants d'insertion existent chez *O. sativa* pour l'orthologue de *CaLRR-RLK1* et pourront être testés en parallèle pour leur implication dans le développement et la résistance aux agents pathogènes (coll. A. Diévert).

2.3. Développement d'un modèle d'étude de la résistance rouille / *A. thaliana*

La croissance d'*H. vastatrix* sur plusieurs espèces non-hôtes est similaire à celle observée dans l'interaction incompatible avec la variété de caféier S4Agaro (Silva *et al.*, 1993). Le parasite est capable de pénétrer par les stomates, puis de produire quelques haustoria avant que sa croissance ne soit stoppée. Afin d'évaluer la possibilité d'utiliser *A. thaliana* comme modèle alternatif au caféier, l'interaction *H. vastatrix* / *A. thaliana* (plante non-hôte) sera étudiée. En collaboration avec le CIFC, la croissance d'*H. vastatrix* chez *A. thaliana* sera mesurée et les réactions cytologiques de la plante à l'infection analysées. En parallèle, nous étudierons les réponses moléculaires de la plante à l'aide de quelques gènes marqueurs de la résistance (PR1 etc...), ainsi que des orthologues des gènes auxquels nous nous intéressons.

3. Conclusion

Les résultats obtenus serviront à préciser le rôle des gènes étudiés dans la résistance du caféier à *H. vastatrix* et, éventuellement, à identifier des réponses spécifiques de la plante associées à des gènes de résistance différents. Les gènes d'intérêt seront aussi évalués dans la résistance aux nématodes (*Meloidogyne* sp.), dans le cadre des recherches menées dans l'équipe par A.C. Lecouls. Les résultats déjà obtenus et ceux à venir devraient contribuer à une meilleure connaissance des réponses naturelles de résistance du caféier aux parasites. L'intégration des résultats obtenus dans l'autre thème de recherche de l'UMR – caractérisation des gènes *R* - devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes généraux de résistance du caféier et une réflexion sur les outils à développer pour contribuer à l'amélioration de *C. arabica* pour une résistance durable aux parasites.

Au delà de l'intérêt fondamental, ces résultats pourront également avoir d'intéressantes répercussions appliquées. Ils pourraient en particulier conduire à identifier des gènes pouvant être utilisés comme marqueurs de sélection efficaces dans les programmes d'amélioration. A court terme, l'identification de gènes impliqués dans l'expression de la résistance fournira des outils complémentaires aux approches de génétique classique pour la sélection de variétés résistantes et permettra de mieux valoriser les ressources génétiques caféières. A plus long terme, ces travaux produiront des éléments pour envisager de nouvelles stratégies de lutte, dans une perspective de durabilité de la résistance des caféiers aux parasites.

4. Critères de faisabilité

4.1. Collaborations

Ces recherches seront conduites en étroite collaboration avec des partenaires Brésiliens (Embrapa-Cenargen à Brasilia et Embrapa/IAC à Campinas), le Brésil étant le premier producteur et exportateur de café arabica. Les trois doctorants de l'équipe proviennent de ces institutions. Par ailleurs, une collaboration forte avec le Centre international sur les rouilles du caféier (CIFC, Portugal) est déjà engagée depuis plusieurs années, dans le cadre de projets bilatéraux France/Portugal financés par le MAE.

Des collaborations sont aussi engagées, mais pas encore formalisées, avec A. Gaitan (phytopathologiste moléculaire du caféier, CENICAFE, Colombie) sur l'analyse des gènes activés dans la résistance à la rouille. Il est notamment prévu de coordonner nos efforts afin d'étudier les mêmes gènes sur différentes variétés de caféier pour vérifier leur rôle dans la résistance. Enfin, nous prévoyons de déposer des projets de coopération avec D. Ganesh (CRC, Inde, spécialiste de culture *in vitro*, en formation biologie moléculaire au

laboratoire en 2004) pour le développement de plants de caféier transformés avec les gènes dont nous souhaitons étudier la fonction.

4.2. Outils

Concernant le caféier, le développement récent d'outils génétiques et génomiques chez *C. arabica* et *C. canephora* permet désormais d'envisager des approches de génomique fonctionnelle chez le caféier. Dans le cadre d'un réseau international de génomique du caféier (ICGN, <http://www.coffeegenome.org>), le développement de cartes génétique et physique de *C. arabica* et *C. canephora* est en cours (Lashermes *et al.*, 2001 ; Noir *et al.*, 2004 ; Pearl *et al.*, 2004), permettant d'envisager le séquençage complet du génome d'ici quelques années. La construction de banques BAC de *C. arabica*, à partir d'une variété introgressée de *C. canephora*, portant des résistances à la rouille et aux nématodes (Noir *et al.*, 2004), et de *C. canephora* (Leroy *et al.*, 2005), fournit un outil précieux pour le clonage de gènes et de leurs promoteurs. Des programmes de séquençage systématique d'ESTs ont été entrepris, de *C. arabica*, en particulier au Brésil (<http://www.lge.ibi.unicamp.br>, Viera *et al.*, 2005), et de *C. canephora* (Lin *et al.*, 2005), qui faciliteront la recherche de gènes candidats, et l'analyse de familles de gènes.

La transformation génétique du caféier est maîtrisée, que ce soit par biolistique ou *via Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes* (Hatanaka *et al.*, 1999, Spiral *et al.*, 1999 ; Van Bostel *et al.*, 1995) et la technique RNAi a été utilisée avec succès (Ogita *et al.*, 2003), permettant d'envisager l'analyse fonctionnelle de gènes en système homologue. La transformation stable de racines de *C. arabica* est déjà mise au point dans l'UMR, en utilisant *A. rhizogenes* pour la création de racines transformées (Alpizar *et al.*, 2006), et le développement de la transformation par *A. tumefaciens* est en cours. Le développement d'un système de transformation transitoire au laboratoire sera une priorité pour ces prochaines années. Cette approche sera rendue possible soit par l'utilisation d'oligodéoxynucléotides antisens (antisens ODN) pour l'extinction de gènes (Sun *et al.*, 2005), soit par la maîtrise de la technique de transformation par agro-infiltration (en cours de mise au point).

Au niveau de l'IRD, et de l'environnement scientifique Montpellierain, nous disposons de plate-formes techniques (GeneTrop, Serres transgéniques, Génopole, Imagerie, etc...) qui peuvent permettre le bon déroulement de ce projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abo K., Klein K. K., Edel-Hermann V., Gautheron N., Traore D. and Steinberg C. 2005. High genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from cotton in Ivory Coast. *Phytopathology* 95:1391-1396.
- Adams K.L. and Wendel J.F. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:135-41.
- Alpizar E., Dechamp E., Espeout S., Royer M., Lecouls A.C., Nicole M., Bertrand B., Lashermes P., Etienne H. 2006. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Rep.* *in press*
- Armstrong G.M., et Armstrong J.K., 1975. Reflections on the wilt Fusaria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13:95-103.
- Armstrong G.M. and Armstrong J.K., 1978. A new race (Race 6) of the cotton-wilt *Fusarium* from Brazil. *Plant Dis. Rep.* 62:421-423.
- Armstrong G.M. and Armstrong J.K. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. In *Fusarium, diseases, biology and taxonomy*. Nelson P.E., Toussoun T.A., et Cook R.J. Eds. The Pennsylvania State University Press. University Park and London, pp 391-399.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M. and Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977-83.
- Baayen R. P., O'Donnell K., Bonants P. J., Cigelnik E., Kroon L. P., Eugène J. Roebroek A., and Waalwijk C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891-900.
- Bertrand B., Guyot B., Anthony F., Lashermes P. 2003. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theor. Appl. Genet.* 107:387-94.
- Bettencourt A.J. and Rodrigues C.J. Jr. 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease, in R.J. Clarke and R. Macrae (eds.), *Coffee vol.4, Agronomy*, pp 199-234 Elsevier Applied Science, London;
- Bonas U. and Lahaye T. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:44-50.
- Brown J.K.M. 1995. Recombination and selection in populations of plant pathogens. *Plant Pathol.* 44:279-293.
- Cao H., Bowling S.A., Gordon A.S., Dong X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 6:1583-1592.
- Cao H., Li X., Dong X. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 95:6531-6.
- 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* 18:243-56.
- Century K.S., Shapiro A.D., Repett, P.P., Dahlbec, D., Holub E., and Staskawicz B.J. 1997. NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science* 278:1963-5.

- Chen C. and Chen Z. 2002. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol.* 129:706-16.
- Combes M.C., Andrzejewski S., Anthony F., Bertrand B., Rovelli P., Graziosi G., Lashermes P. 2000. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Mol. Ecol.* 9:1178-80.
- Coppinger P., Repetti P.P., Day B., Dahlbeck D., Mehlert A. and Staskawicz B.J. 2004. Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 40:225-37
- Correll J.C. 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81:1061-1064
- Daboussi M.J., Langin T. and Brygoo Y. 1992. *Fot1*, a new family of fungal transposable elements. *Mol. Gen. Genet.* 232:12-16.
- Dangl J.L. and Jones J.D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-33.
- Deslandes L., Olivier J., Theulieres F., Hirsch J., Feng D.X., Bittner-Eddy P., Beynon J. and Marco Y. 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:2404-9.
- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D.X., Khounlotham M., Boucher C., Somssich I., Genin S. and Marco Y. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:8024-8029.
- Dievart A., Dalal M., Tax F.E., Lacey A.D., Huttly A., Li J., Clark S.E.. 2003. CLAVATA1 dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development. *Plant Cell* 15:1198-211
- Dievart A. and Clark S.E. 2004. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131:251-61.
- Dong J., Chen C. and Chen Z.. 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* 51:21-37.
- Dong X. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547-552.
- Durrant W.E. and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185-209.
- Eskes A.B. 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Neth. J. Plant Pathol.* 88:127.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S. and Somssich I.E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5:199-206.
- Flor, H.H. 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics* 8:29-54. Academic Press, New York.
- Flor H.H. 1971. Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* 157:493-502.

- Friedrich L., Lawton K., Dietrich R., Willits M., Cade R. and Ryals J. 2001. NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol. Plant Microbe Interac.* 14:1114-1124.
- Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*--2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 301-8.
- Gomez-Gomez L. and Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 5:1003-11.
- Gong Z., Koiwa H., Cushman M.A., Ray A., Bufford D., Kore-eda S., Matsumoto T.K., Zhu J., Cushman J.C., Bressan R.A. and Hasegawa P.M. 2001. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (*sos*) mutants. *Plant Physiol.* 126:363-75.
- Gordon T.R. and Martyn R.D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:111-128.
- Guerra-Guimarães L. 2004. Proteínas relacionadas com a patogenicidade na interação cafeeiro - ferrugem alaranjada. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. 101pp.
- Gurr S.J. and Rushton P.J. 2005. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express ? *Trends Biotechnol.* 23:275-282.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. and Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:463-499.
- Hatanaka T., Choi Y.E., Kusano T. and Sano H. 1999. Transgenic plants of coffee *Coffea Canephora* from embryogenic callus *via Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 19:106-110.
- Hatanaka T., Sano H. and Kusano T. 1999. Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. *Plant Sci.* 140:161-168.
- Heath M.C. 1997. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Ann. Bot.* 80:713-720.
- Herrera J.C., Combes M.C., Cortina H. and Lashermes P. 2004. Factors influencing gene introgression into the allotetraploid *Coffea arabica* L from its diploid relatives. *Genome* 47: 1053 – 1060
- Hulbert S.H., Webb C.A., Smith S.M. and Sun Q. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:285-312.
- Kalde, M., M. Barth, I. E. Somssich, and B. Lippok. 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16:295-305.
- Kim Y., Hutmacher R. B. and Davis R. M. 2005. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Dis.* 89:366-372.
- Kistler H. C. and V. P. W. Miao. 1992. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:131-152.
- Kistler H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87:474-479.
- Kushalappa A.C. and Eskes A.B. 1989. Coffee rust : epidemiology, resistance and management. CRC Press Inc, Boca Raton, Fl., USA, 345p.

- Lam E., Kato N. and Lawton M. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853.
- Lashermes P., Combes M.C., Robert J., Trouslot P., D'hont A., Anthony F. and Charrier A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.* 261:259-266
- Lashermes P., Andrzejewski S., Bertrand B., Combes M. C., Dussert S., Graziosi G., Trouslot P., Anthony F. 2000a. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica*) *Theor. Appl. Genet.* 100:139 – 146.
- Lashermes P., Paczek V., Trouslot P., Combes M.C., Couturon E., Charrier A. 2000b. Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. *J. Heredity* 91:81-85
- Lashermes P., Combes M.C., Prakash N.S., Trouslot P., Lorieux M. and Charrier A. 2001. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meiosis. *Genome* 44:589–596.
- Leroy T., Marraccini P., Dufour M., Montagnon C., Lashermes P., Sabau X., Ferreira L.P., Jourdan I., Pot D., Andrade A.C., Glaszmann J.C., Vieira L.G. and Piffanelli P. 2005. Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. *Theor. Appl. Genet.* 111:1032-41.
- Leslie J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31:127-150.
- Li J., Brader G. and Palva E.T. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16:319-31.
- Li J., Brader G., Kariola T. and Palva E.T. 2006. WRKY70 modulates the selection of signalling pathways in plant defense. *Plant J.* 46:477-491.
- Lin C, Mueller LA, Mc Carthy J, Crouzillat D, Petiard V, Tanksley SD. 2005. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor. Appl. Genet.* 112:114-30.
- Liu XQ, Bai XQ, Qian Q, Wang XJ, Chen MS, Chu CC. 2005. OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1. *Cell Res.* 15:593-603.
- Louvet J. and Toutain G. 1981. Bayoud, *Fusarium* wilt of date palm. p13-20. In: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Nelson PE, Toussoun TA and Cook RJ (Eds.) Pennsylvania State Univ Press.
- Louvet J. 1990. Les bases biologiques et écologiques de la lutte contre les Fusarioses vasculaires de *Phoenix dactylifera* et *Phoenix canariensis*. Seminario de Fitopatologia. El genero *Fusarium*, Univ. de la Laguna, Tenerife, Spain, pp.1-12.
- McDonald B.A. and Linde C. 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124:163 – 180.
- Malek K. and Dietrich R.A. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4:215–219.
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid J., Lawton K.A., Dangl J.L. and Dietrich R.A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26:403-10.

- Marraccini P., Rogers W.J., Caillet V., Deshayes A., Granato D., Lausanne F., Lechat S., Pridmore D. and Petiard V. 2005. Biochemical and molecular characterization of alpha-D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiol. Biochem.* 43:909-20.
- Marraccini P., Rogers W.J., Allard C., Andre M.L., Caillet V., Lacoste N., Lausanne F. and Michaux S. 2001. Molecular and biochemical characterization of endo-beta-mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213:296-308.
- Menke F.L., Champion A., Kijne J.W. and Memelink J. 1999. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J.* 18:4455-63.
- Menke F.L., Kang H.-G., Chen Z., Mee Park J., Kumar D. and Klessig D.F. 2005. Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:1027-1034.
- Mercier S. et Louvet J. 1973. Recherches sur les fusarioses - X. Une Fusariose Vasculaire (*Fusarium oxysporum*) du palmier des Canaries (*Phoenix canariensis*). *Ann. Phytopathol.* 5:203-211.
- Métraux J.P., Nawrath C. and Genoud T. 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica* 124:237 – 243.
- Moncada P. and McCouch S. 2004. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome* 47:501-509.
- Morris E.R. and Walker J.C. 2003. Receptor-like protein kinases: the keys to response; *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:339-342.
- Mou Z., Fan W., and Dong X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-44.
- Mundt C.C., Cowger C., and Garrett K.A. 2002. Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* 124: 245 – 252.
- Nimchuk Z., Eulgem T., Holt B.F. 3rd, Dangl J.L. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.*, 37:579-609.
- Noir S., Anthony F., Bertrand B., Combes M.-C, and P. Lashermes 2003. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathol.* 52:97-103.
- Noutoshi Y., Ito T., Seki M., Nakashita H., Yoshida S., Marco Y., Shirasu K. and Shinozaki K. 2005. A single amino acid insertion in the WRKY domain of the Arabidopsis TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *Plant J.* 43:873-88.
- O'Donnell K., Gherbawy Y., Schweigkofler W., Adler A. and Prillinger H. 1999. Phylogenetic analyses of DNA sequence and RAPD data compared in *Fusarium oxysporum* and related species from maize. *Phytopath. Z.* 147:445-452.
- Ogita S., Uefuji H., Yamaguchi Y., Koizumi N., and Sano H. 2003. Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* 423, 823.
- Park J.M., Park C.J., Lee S.B., Ham B.K., Shin R., and Paek K.H. 2001. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack

- and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13, 1035-46.
- Pearl H.M., Nagai C., Moore P.H., Steiger D.L., Osgood R.V. and Ming R. 2004. Construction of a genetic map for arabica coffee. *Theor. Appl. Genet.* 108:829–835.
- Quirino B.F., Bent A.F. 2003. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the Arabidopsis/Pseudomonas interaction as a model. *Mol. Plant Pathol.* 4:517–30.
- Raina S.N., Mukai Y., Yamamoto M. 1998. *In situ* hybridisation identifies the diploid progenitor of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theor. Appl. Genet.* 97:1204-1209.
- Reymond P. 2001. DNA microarrays and plant defence. *Plant Physiol. Biochem.* 39:313-321.
- Reymond P. and Farmer E.E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:404-11.
- Ryals J., Uknes S. and Ward E. Systemic Acquired Resistance. 1994. *Plant Physiol.* 104:1109-1112.
- Robatzek S. and Somssich I.E. 2001. A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* 28, 123-33.
- Robatzek S. and Somssich I.E. 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 16:1139-49.
- Rodrigues C.J. Jr., Bettencourt A.J. and Rijo L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13: 49-70.
- Ronning C.M., Stegalkina S.S., Ascenzi R.A., Bougri O., Hart A.L., Utterbach T.R., Vanaken S.E., Riedmuller S.B., White J.A., Cho J., Pertea G.M., Lee Y., Karamycheva S., Sultana R., Tsai J., Quackenbush J., Griffiths H.M., Restrepo S., Smart C.D., Fry W.E., Van Der Hoeven R., Tanksley S., Zhang P., Jin., Yamamoto M.L., Baker B.J., Buell C.R. 2003. Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiol.* 131:419-29.
- Rushton P.J. and Somssich I.E.. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:311-5.
- Scheel D. 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:305-10.
- Scheideler M., Schlaich N.L., Fellenberg K., Beissbarth T., Hauser N.C., Vingron M., Slusarenko A.J. and Hoheisel J.D. 2002. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *J. Biol. Chem.* 277, 10555-61.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11655-60.
- Shpak E.D., Lakeman M.B. and Torii K.U. 2003. Dominant-negative receptor uncovers redundancy in the Arabidopsis ERECTA Leucine-rich repeat receptor-like kinase signaling pathway that regulates organ shape. *Plant Cell* 15:1095-110.
- Silva M. C., Rijo L. and Vasconcelos I. 1993. Growth of the coffee orange rust *Hemileia vastatrix* in hosts and nonhosts. Proceedings of the XV Scientific Colloquium on Coffee, ASIC, Montpellier, France, ASIC (eds.), Paris.
- Silva M. C., Nicole M., Rijo L., Geiger J-P. and Rodrigues C. J. Jr. 1999.

- Cytochemical aspects of the plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)-*Hemileia vastatrix* (race II). *Int. J. Plant Sci.* 160:79-91.
- Silva M.C., Nicole M., Guimarães L., and Rodrigues C.J. Jr. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix* - race II) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60:169-183
- Singh K., Foley R.C., Onate-Sanchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:430-6.
- Skovgaard K., Nirenberg H. I., O'Donnell K. and Rosendahl. S. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology* 91:1231-1237.
- Smith S.N., Ebbels D.L., Garber R.H. and Kappelman A.J. 1981. *Fusarium* wilt of cotton. In *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Nelson PE, Toussoun TA and Cook RJ (Eds.) Pennsylvania State Univ Press.
- Somssich I.E. and Hahlbrock K. 1998. Pathogen defence in plants—a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.*, 3, 86–90.
- Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H., Fauquet C. and Ronald P. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270:1804-6.
- Spiral J., Leroy T., Paillard M. and Petiard V. 1999. Transgenic coffee (*Coffea* species). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 44, *Transgenic Trees*, Bajaj Y.P.S. (ed), Springer-Verlag Berlin. p.55-76.
- Sun C., Hoglund A., Olsson H., Mangelsen E. and Jansson C. 2005. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signalling. *Plant J.* 44, 128-138.
- Tao Y., Xie Z., Chen W., Glazebrook J., Chang H.S., Han B., Zhu T., Zou G., and Katagiri F. 2003. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15, 317-30.
- Ülker B. and Somssich I.E. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:491-498.
- Vanderplank J.E. 1968. *Disease Resistance in Plants*. Academic Press, New York.
- Van Bortel J., Berthouly M., Carasco C., Dufour M. and Eskes A. 1995. Transient expression of beta-glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Reports* 14:748-752.
- Van der Vossen, H.A.M. 2001. Agronomy I : coffee breeding practices. In *Coffee, recent developments* (Clarke, R.J. and Vitzthum, O.G., Eds.), Blackwell Sci. Ltd., Paris, France
- Varzea V.M. and Marques D.V. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* versus coffee durable resistance. In "Durable Resistance to Coffee Leaf Rust", (Zambolin L., Zambolin E.M. and Pinto Varzea V.M., Eds, Univ. Fed. Viçosa Pub., Brésil, p.285-304.
- Vieira L.G., Andrade A.C., Colombo C.A. and Pereira G.A.AG. 2005. Coffee genome project : a resource for functional genomics. In "Durable Resistance to Coffee Leaf Rust", L. Zambolin, E.M. Zambolin and V.M.

Pinto Varzea Eds, Univ. Fed. Viçosa Pub., Brésil, p.363-395.

Xu X., Chen C., Fan B. and Chen Z. 2006. Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*. 18:1310-26.

Yu D., Chen C. and Chen Z.. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* 13:1527-1540.

Zhang J.Z. 2003. Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:430-440.

Zhang S. and Klessig D.F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6:520-527.

Zhang Y., Fan W., Kinkema M., Li X. and Dong X. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:6523-6528.

Zhang Y. and Wang L. 2005. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol.*5:1.

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature.* 428:764-767.

ANNEXES

Annexe 1. Assigbétse *et al.* (1994) *Phytopathology*, 84: 622-626.

Cité 75 fois (source ISI)

Annexe 2. Fernandez *et al.* (1994) *Applied Environmental Microbiology*, 60:4039-4046.

Cité 26 fois (source ISI)

Annexe 3. Tantaoui *et al.* (1996) *Phytopathology*, 86, 787-792.

Cité 23 fois (source ISI)

Annexe 4. Fernandez *et al.* (1998) *Applied Environmental Microbiology*, 64, 633-636.

Cité 15 fois (source ISI)

Annexe 5. Bertault *et al.* (1998) *Nature*, 394, 734-734.

Cité 22 fois (source ISI)

Annexe 6. Fernandez and Langin (2002) *Transposable elements in fungi : new diagnostic tools.*

Annexe 7. Fernandez *et al.* (2004) *Molecular Plant Pathology*,5, 527-536.

Annexe 8. Ganesh *et al.* (2006) *Plant Science* 170, 1046-1051