Transformation avec la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* de deux Ascomycètes *Septoria musiva* et *Septoria populicola*, agents phytopathogènes du peuplier

Mémoire

Lauriane VARAIN

Maîtrise en sciences forestières

Maître ès Sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Lauriane VARAIN, 2013

Résumé

Septoria musiva (téléomorphe *Mycosphaerella populorum*) est un Ascomycète responsable de chancres sur tronc et jeunes branches en peupleraies et de taches foliaires en peupleraies et forêts. *S. populicola* (*M. populicola*) est responsable de taches foliaires sur peupliers. L'objectif de mon projet consiste à mettre en place un système de transformation à l'aide d*'Agrobacterium tumefaciens* pour ces deux champignons. *A. tumefaciens* est la bactérie causant la galle du collet, mais qui est utilisée couramment lors de transformation de végétaux et de champignons. Une première expérience a permis d'obtenir des transformants pour *S. musiva* avec le plasmide pPT1, mais aucun transformant n'a été obtenu pour *S. populicola*. Par la suite, un autre plasmide a été utilisé : pPL1. Cependant aucune souche transformée n'a pu être obtenue pour *S. musiva*, et *S. populicola*, malgré la vérification de différents paramètres. L'absence de transformant chez *S. populicola* peut être attribuée à un nombre insuffisant de conidies, tandis que pour *S. musiva*, un nombre insuffisant de bactéries ou un protocole de transformation non optimal pourrait expliquer les échecs successifs.

Abstract

Seporia musiva (*Mycosphaerella populorum*) is an Ascomycota which causes canker and leafspot on hybrid poplar. *S. populicola* (*M. populicola*) only causes leafspot. The aim of my project was to transform these two fungi with *Agrobacterium tumefaciens*, a bacterium which causes Crown gall, and is commonly used to transform plant and fungi in laboratory. In a first experiment, transformation using plasmid pPT1 were successful for *S. musiva,* but not for *S. populicola*. However, no transformants were obtained from either *S. musiva* and *S. populicola* in subsequent experiments in which plasmid pPL1 was used and different parameters were tested. A possible explanation for the inhability to obtain transformants from *S. populicola* is the low number of conidia available for transformation experiments. In the case of *S. musiva*, low number of bacterial cells and non optimal protocols might explain negative results observed.

Remerciements

Je souhaite adresser toute ma gratitude à mon directeur de recherche le Dr Louis BERNIER, qui m'a permis de réaliser ma maîtrise à Québec. Ses conseils judicieux, sa patience et sa disponibilité ont contribué à alimenter ma réflexion scientifique ainsi qu'à la résolution des problèmes rencontrés.

Mes remerciements vont également à mon co-directeur le Dr Philippe TANGUAY, pour son expertise et les connaissances apportées lors de mon projet, ainsi que pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie également le Dr Armand SEGUIN qui a fourni l'aide financière à la réalisation de mon projet.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les collègues et amis qui m'ont exprimé leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche : Marie-Josée MORENCY, Hugo GERMAIN, Adam FOSTER, Marine VAUTIER, Julien PONCHARD, Véronique CLOUTIER.

Enfin je tiens à témoigner toute ma gratitude à l'équipe du Dr. Hamelin pour son accueil: Josyanne LAMARCHE, Nicole LECOURS, Marie-Josée BERGERON, Amélie POTVIN, Françoise PELLETIER, Gervais PELLETIER, Agathe VIALLE, ainsi qu'à l'équipe du Dr. Bernier: Erika Sayuri NARUZAWA, Josée DUFOUR, Joseph Djeugap FOVO et Inès Nelly MOUSSAVOU. Un merci particulier à Jean-Guy CATFORD, pour l'aide apportée lorsque mes expériences me donnaient du fil à retordre.

Au terme de mes remerciements, je souhaiterai rendre hommage aux membres de ma famille pour leur soutien moral et financier.

Table des matières

Résumé iii

Abstract v

Remerciements vii

Liste des Figures xiii

Liste des Tableaux xv

Liste des abréviations xvii

Introduction générale 1

1. Introduction 7

1.1. Introduction 7

1.2. La culture du peuplier 9

1.2.1. La populiculture 9

1.2.2. Importance économique du peuplier 15

1.2.3. Risque écologique 15

1.3. La maladie septorienne 17

1.3.1. Spectre d'hôtes 17

1.3.2. Les symptômes 19

1.4. Les agents causaux : *Septoria musiva* et *Septoria populicola* 24

1.4.1. Biologie des champignons 24

1.4.2. Aire de répartition 28

1.4.3. Diversité et évolution du champignon 30

1.5. Moyens de lutte contre la maladie 31

1.5.1. Lutte biologique 31

1.5.2. Lutte chimique 32

1.5.3. Lutte génétique 32

1.6. La transformation par *Agrobacterium tumefaciens* : un outil pour la génomique fonctionnelle des champignons 40

1.6.1. Généralités sur la génomique fonctionnelle 40

1.6.2. Transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* 42
1.6.3. Inactivation des gènes... 50
1.6.4. Les réussites et échecs de transformations avec *A. tumefaciens* 53
1.7. Conclusion..... 54
2. Transformation aléatoire de *Septoria musiva* et *Septoria populicola* 57
2.1. Introduction 57
2.2. Matériel et méthodes..... 59
2.2.1. Souches fongiques utilisées et milieux de culture 59
2.2.2. Plasmides utilisés 60
2.2.3. Souches bactériennes et milieux utilisés.....61
2.2.4. Transformation de *S. musiva* et *S. populicola* 63
2.2.5. Extraction de l'ADN..... 64
2.2.6. Southern blot..... 65
2.3. Résultats..... 69
2.3.1. La transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*.....69
2.3.2. Transformation de *S. musiva* et *S. populicola* 69
2.4. Discussion..... 84
2.5. Conclusion..... 92
Conclusion générale 94
Bibliographie 96
Annexe 1 : La désactivation des gènes ADE2 et PKS par *Knock-out* . 107
A.1.1. Fabrication des plasmides.....107
A.1.1.1. BP reaction..... 107
A.1.1.2. LR reaction..... 110
A.1.1.3. Souches bactériennes 111
Annexe 2 : Composition des milieux utilisés..... 113
Annexe 3 : Cartes du plasmide pPT1 et pPL1..... 115
Annexe 4 : Cartes des gènes ADE2 et PKS 116

Annexe 5 : Données des transformations pour *Septoria musiva, Septoria populicola, Septoria populi* 117

Liste des Figures

Figure 1.1 : Taches nécrotiques causées par *Septoria musiva* sur un peuplier.....20

Figure 1.2 : Chancre septorien causé par *Septoria musiva* sur un peuplier hybride 21

Figure 1.3 : Taches nécrotiques causées par *Septoria populicola* sur peuplier.....23

Figure 1.4 : *Septoria musiva* (souche so2202) sur *PDA* (en haut), et sur *Cereal mix medium* (en bas) 26

Figure 1.5 : *Septoria populicola* (souche 02165A) sur *PDA* 27

Figure 1.6 : Galle du collet sur *Euonymus* causée par *Agrobacterium tumefaciens* (en haut, vue de la bactérie en microscopie électronique), source: www.apsnet.org.....43

Figure 1.7 : Mécanisme de transfert de l'ADN chez *Agrobacterium tumefaciens* (d'après le schéma de Michielse *et al.*, 2005).....45

Figure 1.8 : Principe de la transformation fongique avec *Agrobacterium tumefaciens* 48

Figure 1.9 : Principe de l'inactivation d'un gène (d'après Etienne *et al.,* 2006).....50

Figure 2.1 : Montage du transfert du gel d'électrophrèse à la membrane de nylon 67

Figure 2.2 : Radiographie du *Southern blot* pour 12 souches testées de *Septoria musiva* transformée par *Agrobacterium tumefaciens* 74

Figure 2.3 : Schéma des résultats attendus (en haut) et photographie des résultats obtenus lors de l'éctrophorèse (en bas) de la digestion du plasmide pPT1 76

Figure 2.4 : Schéma des résultats attendus (en haut) et photographie de l'électrophorèse des résultats obtenus de la digestion du plasmide pPL1 78

Figure A.1 : Principe du kit *MultiSite Gateway*® d'Invitrogen 111

Liste des Tableaux

Tableau 2.1: Récapitulatif des 26 expériences de transformations 70

Tableau 2.2 : Fréquence de germination pour les conidies (200) de *Septoria musiva* mises en présence de deux souches d'*Agrobaterium tumefaciens* C58::pMP90 et GV3101::pMP90 81

Tableau 2.3 : Fréquence de germination de 200 conidies de *Septoria musiva* sur membrane de cellophane..... 82

Tableau 2.4: Nombre moyen de conidies de *Septoria musiva* lors des

26 transformations 82

Tableau 2.5: Nombre moyen de conidies de *Septoria populicola* pour les transformations 1 à 5 83

Tableau 2.6: Nombre moyen de conidies de *Septoria populi* pour les transformations 6 à 11 83

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ADE2	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (AIR carboxylase)
ADN ou DNA	Acide Désoxyribonucléique ou *Deoxyribonucleic Acid*
ARN ou RNA	Acide Ribonucléique ou *Ribonucleic Acid*
DO	densité optique
EDTA	*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (Acide ethylène-diamine-tétracétique)
KO	*Knock-out* (recombinaison homologue)
IM	*Induction Medium* (milieu d'induction)
LB	Luria Broth
M	molaire
mM	millimolaire
MM	Milieu minimum
N	Normal
N	Azote
pb ou bp	paires de base (*base pairs*)
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (réaction de polymérase en chaîne)
PDA	*Potato Dextrose Agar*
PEG	Polyéthylène glycol
PKS	Polyketide synthase
rpm	*revolution per minute* (tour par minute)
SOC	*Super Optimal Broth with Catabolite repression*
SSC	*Saline Sodium Citrate*
TAE	Tris Acetate EDTA
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris-HCl (0,1 M), EDTA (0,01M)
UV	Ultra-Violet
YEP	*Yeast Extract Peptone*
2×YT	*Yeast Extract Tryptone*

Introduction générale

Depuis ces 40 dernières années, la culture du peuplier s'est développée en Amérique du Nord. Elle s'applique aussi bien aux grandes plaines, pour servir de brise-vent, que dans la foresterie pour produire du bois, des fibres et de la biomasse permettant la production d'énergie. Afin de réaliser un meilleur rendement, des peupliers hybrides ont été créés, à partir de divers peupliers sauvages d'origines américaines, européennes et asiatiques (Bigué *et al.*, 2011 ; Dickmann *et al.,* 2001).

Avec l'expansion de la culture de peupliers hybrides, une nouvelle maladie est apparue: le chancre septorien, causé par le champignon *Septoria musiva* (téléomorphe *Mycosphaerella populorum* Thompson). Cet agent pathogène cause des taches nécrotiques sur feuilles et des chancres sur tronc et jeunes branches, provoquant une diminution de la production de bois. Ceci aboutit à des pertes de rendement et, dans certains cas, à l'échec de la culture, comme dans les années 80 en Ontario et aux États-Unis (Ostry et McNabb*,* 1985). Des pertes de biomasse allant jusqu'à 60% ont été rapportées dans les plantations où la présence de *S. musiva* a été observée (Liang *et al.,* 2002). Un autre agent pathogène, *S. populicola* (téléomorphe *Mycosphaerella populicola* G. E. Thompson), provoque également des taches foliaires, aboutissant dans des cas extrêmes, à une défoliation précoce dans les peupleraies, donc une perte de croissance et de productivité (Gagné, 2005).

Ces deux agents phytopathogènes appartiennent au groupe des Ascomycètes et sont de l'ordre des Dothideales. Présent uniquement en Amérique du Nord, *S. populicola* reste un agent pathogène peu dommageable, comparé à *S. musiva* qui provoque des dommages directement sur le tronc, et donc sur la qualité du bois. Mais, il a été possible de provoquer la formation en conditions contrôlées d'un chancre, avec une souche spécifique de *S. populicola*, ce qui rend cette espèce potentiellement dangereuse en cas de mutation naturelle du champignon (Zalasky, 1978 ; Newcombe et Ostry, 2001). Notamment si cette mutation le rend plus agressif, et donc plus dangereux pour les hybrides utilisés à l'heure actuelle (Newcombe et Ostry, 2001 ; Leboldus *et al.*, 2009). *S. musiva* a longtemps été

rapporté uniquement en Amérique du Nord mais il a été isolé en Argentine et également trouvé en 2010 au Brésil. Cela démontre une expansion du champignon possible dans le reste du monde (Sivanesan, 1990 ; Feau *et al.,* 2010 ; Santos *et al.*, 2010).

Le principal moyen de lutte utilisé contre le chancre septorien à l'heure actuelle en Amérique du Nord est la production de peupliers hybrides résistants à la maladie. La lutte chimique n'a pas démontré une grande efficacité sur le long terme (Ostry et McNabb, 1983 ; Lo *et al.*, 1995), alors que la lutte biologique n'est pas appliquée à l'échelle opérationnelle. Le captafol, ainsi que le Benomyl ont montré de bons résultats sur le court terme pour la lutte chimique contre le chancre septorien. Le captafol utilisé en pulvérisation tôt dans la saison et à mi-saison de croissance végétative, ou pulvérisé bimensuellement, a montré un niveau de résistance proche de celui des clones résistants. Le Benomyl utilisé à une dose de 1 livre d'ingrédients actifs pour 100 gallons[1] d'eau a montré une diminution du nombre de chancres par rapport aux autres traitements chimiques utilisés (Ostry et McNabb, 1983). En lutte biologique, deux organismes ont également été utilisés pour tester leur activité anti-fongique sur *S. musiva*. Le premier organisme est le champignon *Phaeotheca dimorphosphora* DesRoch. & Ouel., qui a une activité antibiotique sur plusieurs pathogènes, dont *S. musiva* (Yang *et al.*, 1994). Des isolats de bactéries appartenant à l'espèce *Streptomyces* ont également été utilisés et ont montré *in-vitro* une inhibition des cultures de *S. musiva*. Appliquée en suspension sur des peupliers, cette espèce a également permis de réduire significativement l'aire des taches nécrotiques de *S. musiva* sur les feuilles (entre 63 et 75%), mais a également réduit de 55 à 91% la défoliation (Gyenis *et al.*, 2003). Au Québec, l'utilisation de produits chimiques en foresterie pour lutter contre les maladies est interdite (Ministère des Ressources Naturelles, 2011). L'amélioration génétique des peupliers est donc le seul moyen, à l'heure actuelle, de lutte contre le chancre septorien. De plus, dans la province, seuls les hybrides ayant l'une des résistances au chancre septorien sont utilisés, les hybrides sensibles étant prohibés (Bigué *et al.,* 2011).

[1] 1 livre pour 100 gallons d'eau : 454 grammes pour 378 Litres d'eau.

À l'heure actuelle, seules quelques études génétiques ont été menées sur *S. musiva*. L'une d'elles a permis de mettre en évidence la diversité génétique des populations entre trois régions : le Wisconsin, l'Ontario et le Québec (Feau *et al.,* 2005a). Cette étude a également permis de mettre en évidence la façon dont se disperse majoritairement la maladie : par l'effet *rain splash.* La diversité génétique des trois populations doit être prise en compte car, comme le soulignent les auteurs, dans un contexte épidémiologique, il faudrait mieux surveiller les échanges de matériel végétal entre les provinces et les États. En effet, chaque population est différente, et présente des sous-populations riches en diversité génétique (Feau *et al.,* 2005a).

Par la suite, une étude transcriptomique a été menée pour créer une collection d'étiquettes de type *Expressed Sequence Tags* (*EST*) pour *S. musiva*, en utilisant les techniques de marqueurs *Simple Sequence Repeats* (*SSR*) et de *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (*PCR-RFLP*), permettant la création de marqueurs de régions codantes du génome du champignon. Ces marqueurs de locus spécifiques sont transférables à d'autres laboratoires situés dans les zones de cultures intensives de peupliers et ils sont adaptés à la réalisation d'études de population plus importantes de *S. musiva* et qui sont comparables entre elles. Les résultats obtenus pour ces marqueurs sont d'ailleurs cohérents avec l'étude de populations réalisée par Feau *et al.*, en 2005a qui déterminait une différence significative des valeurs observées avec les marqueurs *RAPD* dans les populations étudiées (Feau *et al.,* 2006b).

Cependant, aucune étude sur la génomique fonctionnelle n'a été publiée chez *S. musiva* et *S. populicola.* Pour cela, différentes méthodes sont envisageables. Ainsi, les différentes techniques de biologie moléculaire actuellement disponibles peuvent être utilisées pour étudier le rôle des gènes. Cette étude peut porter sur la virulence (capacité d'un pathovar à surmonter la résistance verticale d'une variété, Lepoivre, 2007) des agents pathogènes, ou sur la pathogénicité (capacité d'un organisme à induire une maladie, Lepoivre, 2007) même des champignons. L'interêt de séquencer un génome d'un organisme est d'acquérir le catalogue des gènes qui sont nécessaires à la survie et à la reproduction de l'organisme. Dans le cas d'agents pathogènes, il est également possible de

déterminer la région impliquée dans la pathogénicité, en comparant son génome à un organisme non-pathogène qui lui est proche phylogénétiquement. Cela a également l'avantage de réduire le nombre de gènes soumis à une analyse (Institut Pasteur, 2013). Le récent séquençage du génome de *S. musiva* par le *Joint Genome Institute* aux États-Unis (*DOE Joint Genome Institute*, 2010), rend possible l'étude de certains gènes d'interêt, comme les gènes responsables de la formation du chancre, ou ceux responsables de la tache foliaire. Il est alors possible d'envisager sur le long terme la mise en place d'un moyen de lutte efficace contre cette maladie. Il est également possible d'étudier les gènes d'interêt par la comparaison bio-informatique avec d'autres génomes de *Septoria*, ou d'autres agents phytopathogènes, et de sélectionner des gènes d'intérêt. Il est possible alors d'étudier l'expression d'un gène, par l'intermédiaire notamment des acides ribonucléiques messagers (ARNm) ou par la création de mutants, d'effectuer une étude sur le produit des gènes, c'est-à-dire les protéines, ou encore d'étudier les voies métaboliques. Chacune de ces études fait appel à des méthodes d'analyses qui lui sont propres.

Dès lors que l'on connaît le génome d'une espèce, il est possible de le comparer avec celui d'une autre espèce, proche ou non phylogénétiquement. On peut alors voir si un gène présent chez une espèce, est également présent chez une autre. Il est notamment possible de comparer les deux génomes des deux *Septoria*, après l'annotation des deux génomes, pour par exemple comparer le ou les gènes responsables de la formation de chancre dans le cas de *S. musiva,* et vérifier sa présence ou son absence chez *S. populicola.* Pour cela, on peut identifier le gène chez une autre espèce fongique provoquant des chancres, et vérifier sa présence chez les deux *Seporia*. Chez *S. populicola*, Zalasky (1978), ainsi que Newcombe et Ostry (2001) ont observé de manière exceptionnelle la formation de chancre, dans des essais en serre par une souche particulière de cette espèce. Cependant, dans le cas de Newcombe et Ostry (2001), l'observation du chancre n'a pas pu être vérifiée une seconde fois. Ceci peut s'expliquer en partie par l'utilisation par Newcombe et Ostry (2001) de deux souches différentes, lors de leurs expériences respectives.

Dans le cadre de ce mémoire, je vais m'intéresser à la création de mutants. Cela permettra par la suite d'observer directement l'impact de la mutation au niveau

phénotypique, au niveau de la pathogénicité de l'espèce et de la virulence des mutants. La méthode de création de mutants est basée sur deux grands principes :

- soit créer des mutations de façon aléatoire, sans aucun contrôle sur la zone où la mutation se fait. Dans ce cas, on utilise des produits induisant une mutation, les ultra-violets (UV), les rayons X, les matériaux radioactifs ou encore des agents chimiques comme la moutarde d'azote et le sulfonate d'éthyle méthane (EMS) (Hartl et Jones, 2003).

- soit une mutation par insertion d'un gène modifié avec, par exemple, la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Dans le second cas, la mutation peut également être aléatoire. Il s'agit alors d'une recombinaison non homologue. Dans ce cas, si la mutation est présente dans une zone non codante du génome, elle ne s'exprimera pas, et donc ne sera pas visible. Si la mutation se situe dans l'intron[2] du gène, dans la zone à coté de l'exon[3], l'intron peut ne pas être éliminé lors de l'épissage, et la protéine formée est alors aberrante puisque l'intron y est présent. Mais le plus souvent, dans ce type de mutation, le produit de la traduction ne se trouve pas, soit par ce que l'ARN est éliminé, soit la traduction n'a pas lieu, ou encore la protéine formée est aberrante et rapidement dégradée. Si la mutation est à l'intérieur de l'intron, cela peut empêcher le pliage de l'intron et « l'excision-épissage » de l'ARN (Etienne *et al*., 2003). Il y a également la possibilité de cibler l'endroit où va se faire la mutation, par l'insertion d'un gène homologue muté dans le gène présent chez la souche étudiée, ou dans la zone de régulation du gène (en amont ou en aval). Cette zone de régulation permet alors soit une surexpression, soit un arrêt de l'expression du gène. Ceci se base sur la technique de l'inactivation des gènes (en anglais le *Knock-out*) (Etienne et Clauser, 2004). Pour cibler le gène et l'inactiver, il est important de connaître la séquence du gène. Cette technique vise principalement à inactiver un gène, pour ainsi étudier sa

[2] Intron : « séquence d'ADN non-codante d'un gène, transcrite et ensuite excisée du transcrit primaire pour former une molécule d'ARNm mature ; cette séquence se trouve principalement chez les Eucaryotes » (Hartl et Jones, 2003).

[3] Exon : « séquences d'un gène qui sont retenues dans l'ARN messager après que les introns ont été éliminés du transcrit primaire » (Hartl et Jones, 2003).

fonction. En effet, il est possible de voir les conséquences anatomiques, ou physiologiques dues à l'absence de la protéine de ce gène (Etienne et Clauser, 2004).

Après un premier chapitre introduisant la populiculture, la maladie et les agents phytopathogènes, et une présentation générale de la méthode de transformation utilisée, je vais dans un second chapitre présenter la première partie de mon projet. Celle-ci consiste à mettre en place une technique de transformation de *S. musiva* et *S. populicola* pour, dans un second temps, étudier des gènes d'intérêt et leur fonctionnement.

1. Introduction

1.1. Introduction

Le peuplier a été considéré par les Amérindiens comme une plante sacrée, pour ses vertus médicinales, car il était utilisé comme désinfectant, remède contre différentes maladies, mais aussi comme source de nourriture. Le mot *Populus* aurait pour origine une expression romaine *arbor populi* qui signifie arbre du peuple, car cet arbre a souvent été planté dans des lieux publics. Alors que la populiculture existe en Europe depuis plus de quatre siècles, il faut attendre la fin des années 1960, pour que la culture d'hybrides débute au Québec. En 1750, la culture d'hybrides commence en Europe, et les explorateurs du Nouveau Monde y rapportent deux nouvelles essences : le peuplier baumier (*Populus balsamifera*) et le peuplier deltoïde (*P. deltoides*) (Bigué *et al.,* 2011).

Au 18ème et au 19ème siècles, les nouveaux immigrants apportent de nouvelles espèces de peupliers dans la région des prairies canadiennes, sous forme de boutures. Le peuplier est alors utilisé comme haie contre le vent et la neige, pour produire du bois de chauffage, et diminuer l'érosion des sols agricoles. En 1901, un programme de plantation est mis en place en Saskatchewan. En 1969, débute au Québec le premier programme d'amélioration génétique du peuplier. L'objectif principal est de produire des variétés performantes, bien adaptées aux conditions bioclimatiques des régions, et tolérantes aux principales maladies (Bigué *et al.,* 2011).

A l'heure actuelle, le peuplier reste une essence marginale comparée aux essences résineuses, comme l'épinette noire, même si depuis 2001, entre 1,5 et 2 millions de peupliers sont livrés annuellement dans tout le Québec. La populiculture se fait sur des terres agricoles marginales, ou en milieu forestier, car le peuplier n'est pas reconnu comme une culture agricole, contrairement au saule. Aux États-Unis, en France et en Chine notamment, la culture se fait en vallées agricoles fertiles (Bigué *et al.,* 2011).

De nombreux hybrides ont été créés à partir d'espèces sauvages, comme *Populus deltoides* et *P. trichocharpa*, ce qui a permis d'obtenir des troncs de bonne circonférence

(Soulères, 1992). Ces hybrides ont différentes origines : l'une spécifiquement interaméricaine, l'autre euraméricaine (dont l'un des parents est américain, et l'autre européen) (Soulères, 1992). Au fil des sélections, l'homme a privilégié des qualités à effet de produire plus, plus rapidement. Mais, bien souvent, cela se fait au détriment de la résistance à certaines maladies.

Ainsi, depuis plusieurs années, le chancre septorien est devenu une maladie épidémique en Amérique du Nord dans les plantations de peupliers, alors qu'elle est restée à l'état endémique dans les forêts (Gagné, 2005). Cette maladie pose de nombreux problèmes, puisqu'elle ralentit l'expansion de la populiculture au Canada. En effet, un grand nombre des arbres utilisés sont tolérants à la maladie, voire sensibles dans certaines régions de l'Ouest du Canada. Elle cause de nombreux dégâts, principalement sur le tronc et les branches en les fragilisant, mais également par l'apparition de taches foliaires qui diminueraient l'activité photosynthétique de l'arbre, et donc la production de bois (Krupinsky, 1989 ; Lo *et al.,* 1995 ; Feau *et al.,* 2010).

Le chancre septorien est dû à un champignon, *Septoria musiva*, dont la forme téléomorphe est *Mycosphaerella populorum* Thompson (Thompson, 1941). Il s'agit d'un agent pathogène de l'ordre des Ascomycètes qui a été capable de provoquer l'échec de plantations (Strobl et Fraser, 1989). Lorsque le champignon est présent dans un peuplier, il le fragilise et entraîne la pénétration d'autres organismes, comme des champignons appartenant aux genres *Cytospora, Discosporium*, *Fusarium, Phomopsis* (Lo *et al.,* 1995 ; Stanosz et Stanosz, 2002).

D'autres champignons de l'ordre des *Septoria* sont également pathogènes sur le peuplier (ici, ne sont cités que les deux principaux):

- *Septoria populicola* suscite également des taches foliaires, mais cause peu de dommages en milieu naturel. Il ne semble cependant pas capable de former des chancres naturellement, bien qu'il ait été possible de forcer *S. populicola* dans des essais en serre (Zalasky, 1978 ; Newcombe et Ostry, 2001). Il est présent en Amérique du Nord.

- *S. populi* provoque également des taches foliaires et est présent uniquement en Europe (Feau *et al*. 2005b).

Une méthode sensible et spécifique basée sur la *PCR* des régions *Internal Transcribed Spacer* (*ITS*) a permis de différencier ces trois espèces (Feau *et al.,* 2005b).

Quelques études ont été menées sur ces maladies, depuis de nombreuses années. L'objectif de ce chapitre est de faire le point sur les connaissances de la populiculture, les maladies causées par *S. musiva* et *S. populicola*, les moyens de lutte mis en place à l'heure actuelle, ainsi que de la méthode de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Pour cela, une première partie traitera de la culture du peuplier d'une façon générale. Une seconde portera sur les deux champignons, avant d'aborder les maladies septoriennes, leurs aires de répartition, leurs spectres d'hôtes et les moyens de lutte actuellement disponibles. Enfin, ce chapitre se terminera sur une présentation de la génomique fonctionnelle, avec notamment une présentation de la bactérie *A. tumefaciens*, utilisée comme technique de transformation des deux *Septoria*.

1.2. La culture du peuplier

Le peuplier est une essence importante en Amérique du Nord. Il est utilisé comme brise-vent ou dans la production de bois (Krupinsky, 1989, Dickmann *et al.*, 2001). En 2011, 40% du volume de peuplier indigène qui est récolté l'est pour le bois rond, contre 45% pour la plantation du peuplier hybride, au Canada. En moyenne, 3 750 000 m^3 de la pâte à papier de bois provenaient du peuplier indigène, pour 100 000 m^3 de la pâte à papier de bois provenant de plantation de peupliers. Au Canada, 27 559 ha de peupliers hybrides ont été plantés en 2011 (Conseil du peuplier du Canada, 2012). La production de bois de feuillus était fournie par les peuplements naturels, et les plantations de peupliers (Commission Internationale du peuplier*,* 2008).

1.2.1. La populiculture

La populiculture s'inscrit dans la ligniculture qui est la forme très intensive de la sylviculture en plantation. Comme les peupliers croissent rapidement, il est possible de

diminuer le temps de rotation, et donc produire rapidement de la matière ligneuse (Bigué *et al.*, 2011).

1.2.1.1. Généralités

Le peuplier est un ligneux à croissance rapide. Quelle que soit la variété cultivée, les peupliers ont des caractéristiques communes (Soulères, 1992).

Ils appartiennent au genre *Populus* et sont des espèces décidues. Il s'agit d'un genre réparti dans tout l'hémisphère nord des tropiques à la limite nordiques des arbres en Amérique du Nord, en Europe et en Asie (Bigué *et al*., 2011).

Les peupliers ont une courte vie, car ils sont souvent les hôtes de maladies ou d'insectes, mais leur croissance est rapide (Bigué *et al.,* 2011). Ce sont des arbres dioïques, c'est-à-dire qu'il existe des plants mâles et des plants femelles (Soulères, 1992 ; Dickmann *et al.*, 2001 ; Bigué *et al*., 2011).

Les peupliers sont des espèces qui réalisent la multiplication végétative par drageons[4] de façon naturelle. Les racines de peupliers possèdent des méristèmes qui se prêtent au développement d'un nouveau plant génétiquement identique au plant « mère ». Tous les peupliers peuvent être propagés en populiculture par voie asexuée, mais il existe différentes méthodes selon l'espèce utilisée et la section à laquelle le peuplier appartient. Les peupliers de la section *Tacamahaca* peuvent par exemple être bouturés par les drageons, en quelques jours, dans des conditions de sols chauds, et humides (Dickmann *et al.*, 2001). Quant aux peupliers appartenant à la section *Aigeros*, ils sont principalement bouturés par les ramets (Soulères, 1992). En populiculture, la reproduction sexuée n'est utilisée que pour obtenir de nouvelles variétés. Lorsque les peupliers sont obtenus par la sélection d'arbres en plantation, on parle alors de cultivars, ou de clones (Soulères, 1992).

[4] « Le drageon est un rejet naissant à partir d'un bourgeon situé sur une racine ou une tige souterraine » (Bastien et Gauberville, 2011).

Il existe de nombreuses variétés de peupliers, que l'on peut classer en 6 sections (les espèces principalement utilisées en populiculture sont citées, mais il en existe beaucoup plus):

- Section *Abaso,* avec *Populus mexicana*, d'origine mexicaine ;

- Section *Tacamahaca* (les baumiers) avec *P. balsamifera, P. trichocarpa* et *P. maximoviczii ;*

- Section *Aigeros* (les peupliers noirs) dont plusieurs cultivars appartiennent aux espèces *P. deltoides* et *P. nigra ;*

- Section *Turanga*, qui sont des peupliers afro-asiatiques, avec *P. euphratica*, *P. ilicifolia*, *P. pruinosa ;*

- Section *Leucoides* (peuplier des marécages), avec *P. glauca*, *P. heterophylla* L. et *P. lasiocarpa ;*

- Section *Populus* (peupliers blancs et peupliers faux-trembles), avec *P. alba* (peuplier blanc) et *P. tremuloides* (faux-tremble) (Institut pour le développement forestier, 1982 ; Dickmann *et al.,* 2001).

Cinq espèces sont utilisées principalement en amélioration des arbres: *P. deltoides, P. trichocarpa, P. balsamifera, P. nigra* et *P. maximoviczii,* pour produire des hybrides interaméricains, euraméricains, et américano-asiatiques très performants. Majoritairement, les hybrides interaméricains sont obtenus par le croisement *P. deltoides* et *P. trichocarpa*. Les hybrides euraméricains sont issus de croisements avec *P. nigra* comme un des deux parents. D'autres hybrides sont obtenus également avec *P. maximoviczii*, comme l'un des deux parents (Dickmann *et al.*, 2001 ; Bigué *et al.*, 2011).

1.2.1.2. Peupliers noirs (section Aigeros, *Populus deltoides*)

Il s'agit d'une variété de peupliers qui se caractérise par des feuilles en forme de delta.

Ce sont des arbres très droits, couronnés d'une cîme ample avec de grosses branches, ce qui les rend sensibles au vent. Ils sont recouverts d'une écorce rugueuse avec une forte crête liégeuse, souvent en forme de M (Soulères, 1992 ; Dickmann *et al.,* 2001). Le peuplier deltoïde, nommé peuplier noir, trouve ses origines dans le bassin du Mississippi et ses affluents que sont l'Ohio et le Missouri. C'est une espèce qui occupe une aire importante de répartition naturelle, et qui est à l'origine d'une grand nombre d'hybrides. Il colonise les milieux alluviaux, ce qui donne lieu à des forêts-galeries. Cependant, cette espèce peut être facilement concurrencée par d'autres feuillus, comme l'érable rouge (en tant qu'espèce pionnière), aboutissant à sa disparition (Soulères, 1992 ; Dickmann *et al.,* 2001).

1.2.1.3. Peuplier baumier (section *Tacamahaca*)

P. trichocarpa est l'un des nombreux représentants des peupliers baumiers. Il est originaire du nord-ouest des États-Unis. On peut le trouver de la Californie à l'Alaska mélangé à des résineux et des feuillus. Un autre représentant est *P. balsamifera*. Il est présent dans tout le Canada, le nord des États-Unis, et l'Alaska. Il est le peuplier qui pousse le plus au nord du continent nord américain (Dickmann *et al*., 2001). Les peupliers baumiers utilisés en populiculture ont des caractères communs, malgré un nombre élevé de cultivars (Soulères, 1992 ; Dickmann *et al.,* 2001):

- la forme forestière est élancée, le tronc est droit avec une cîme étroite ;

- les feuilles sont assez grandes, ce qui les rend sensibles au vent, et diminue leur activité photosynthétique ;

- la face inférieure et la face supérieure des feuilles sont bien différenciées : la face inférieure est pâle et la face supérieure est vert foncé ;

- le bouturage et la plantation en plançon[5] sont excellents ;

[5] « Longue et forte bouture droite, lignifiée et élaguée, plantée profondément en terre pour obtenir un peuplier» (Bastien et Gauberville, 2011).

- l'enracinement est superficiel, ce qui l'avantage pour une culture en sol peu profond ;

- la sensibilité au phototropisme est faible ;

- la croissance est possible sur un sol d'une forte teneur en argile, et un pH bas ;

- la concurrence par d'autres espèces ligneuses est bien tolérée ;

- la sensibilité aux rouilles est importante, et le gibier l'apprécie.

Au début de leur croissance, les peupliers baumiers sont vulnérables à la submersion temporaire du sol, et au parasitisme sur sol sableux. Le baumier a une réputation de peuplier nordique (Soulères, 1992 ; Dickmann *et al.,* 2001). Il existe également une autre espèce de peupliers baumiers qui est utilisée en populiculture: *P. maximoviczii.* D'origine asiatique, ce peuplier est sensible au chancre septorien, mais a une bonne adaptation aux sols moyennement fertiles et acides, et est bien aclimaté au Québec. Ainsi, les hybrides formés avec ce peuplier comme parent présentent une bonne résistance au climat québécois. Il présente également des résistances aux maladies et aux ravageurs les plus répandus en Amérique du Nord, comme la rouille causée par *Melampsora*, ou les brûlures des pousses causées par *Venturia*. Ceci permet d'obtenir un bon parent qui présente de nombreux caractères d'amélioration, entraînant un large choix de caractéristiques recherchées à court et long terme (Dickmann *et al.*, 2001).

1.2.1.4. Peupliers euraméricains

Il s'agit d'hybrides obtenus à partir d'un croisement entre *P. nigra* (mâle) et *P. deltoides* (femelle), qui sont des espèces naturelles. Le croisement inverse semble peu fréquent. *P. nigra* est un peuplier d'origine italienne. Ces hybrides sont composés d'un seul groupe hétérogène, dont font partie le peuplier canadien et le peuplier Régénéré (Soulères, 1992).

Les peupliers euraméricains croissent aisément sur des milieux alluviaux secs, d'une texture sableuse, avec une richesse minérale réduite. Ils ont des exigences plus importantes,

ce qui limite leur utilisation à des stations de bonne qualité, et nécessitent des soins de cultures (Soulères, 1992).

Ils ont une bonne productivité en sylviculture intensive. Ils sont faciles à cloner et à utiliser par la technique du plançon. Cependant, il faut noter que dans ces hybrides, de nombreux cultivars sont sensibles aux maladies comme le chancre bactérien, la rouille des feuilles causées par *Melampsora laricipopulina*, *etc* (Soulères, 1992).

1.2.1.5. Hybrides interaméricains

Ces peupliers hybrides sont issus du croisement entre trois peupliers nord-américains : *P. balsamifera, P. deltoides* et *P. trichocarpa.* Le premier apporte l'adaptation aux milieux difficiles pour la populiculture, et le second la qualité du bois. Ce sont des peupliers vigoureux, mais également plus exigeants que les peupliers baumiers. Ils donnent également une meilleure qualité de bois (Soulères, 1992). Ils présentent une bonne rectitude du tronc, mais sont moins amples, moins élancés et leurs branches moins grosses. L'écorce reste lisse pendant une longue période, avant d'avoir une partie marquée liégeuse de plus en plus prononcée, provenant de *P. deltoides*. Au fur et à mesure de leur croissance, ils produisent de moins en moins de branches (Soulère, 1992).

Contrairement aux autres peupliers, ils ont une croissance particulière : la saison de végétation est décalée, par rapport à la majorité des hybrides euraméricains artificiels. Cela se traduit par une croissance en circonférence jusqu'en septembre, voire octobre, mais le débourrement reste commun à ces espèces. Ils sont également peu sensibles au phototropisme, et d'une bonne réactivité face à la culture intensive. Ils fournissent une généreuse production de bois quel que soit le type de milieux (alluviaux et hors vallées) (Soulères, 1992). Il existe un cas de peuplier hybride naturel : *P.× jackii*, qui est issu du croisement naturel entre *P. deltoides* et *P. balsamifera*. Les autres hybrides ne sont pas présents naturellement en forêt, car les aires de répartitions naturelles de leurs parents ne sont pas forcément les mêmes, comme c'est le cas pour *P. deltoides* et *P. trichocarpa* (Feau *et al.,* 2010).

1.2.2. Importance économique du peuplier

Le peuplier exerce deux rôles majeurs en Amérique du Nord. Le premier est son utilisation dans les grandes plaines du nord et du centre des États-Unis, depuis l'arrivée des immigrants Européens aux 18^{e} et 19^{e} siècles. Grâce à sa croissance rapide, et sa capacité de croître sur des sols variés et des conditions climatiques diverses, il créé des murs naturels, pour casser les lignes de vent que ce soit pour protéger les fermes, le bétail ou les cultures (Krupinsky, 1989 ; Dickmann *et al.*, 2001). En effet, le vent est vecteur de maladies végétales sur de longues distances. En l'absence de brise-vent, celui-ci peut également se renforcer et être dommageable pour les cultures. Le brise-vent permet également en été de fournir une zone d'ombrage pour les humains et le bétail, tout en permettant d'augmenter la valeur de la ferme, la beauté du paysage, et en diminuant le bruit et la poussière tout en favorisant un habitat pour la faune sauvage (Dickmann *et al.*, 2001).

La seconde utilisation du peuplier est la sylviculture. La rapidité de croissance, ainsi que son potentiel d'hybridation sont deux des caractéristiques du peuplier qui les rendent intéressants pour la sylviculture et lui permettent d'être bien adapté à la culture intensive (Feau *et al.*, 2010). Au Canada, le peuplier représente 62% du volume total de la production de bois de feuillus. Au Québec, 1500 ha de peupliers sont plantés chaque année et entre 1 et 1,5 million de peupliers hybrides sont annuellement délivrés aux producteurs (Commission Internationale du peuplier*,* 2008).

Les principales utilisations du bois de peuplier sont les dérivés de bois, comme le contreplaqué, les fibres, et l'énergie. Ceci a entraîné, ces 40 dernières années, une augmentation significative de la populiculture du Nord de l'Amérique (Ménétrier, 2008).

1.2.3. Risque écologique

La majorité des peupliers utilisés en populiculture sont des hybrides multipliés par multiplication végétative. La plupart des cultivars sélectionnés l'ont été pour leur rapidité de croissance, leur facilité à se multiplier par bouturage, et une forte production de biomasse ligneuse (Soulères, 1992).

Cependant, au fur et à mesure du développement et de l'intensification de la culture du peuplier, de nouvelles maladies sont apparues. En effet, la plupart des essences hybrides si ce n'est toutes, sont sensibles à diverses maladies. Actuellement, il est possible d'utiliser des hybrides ayant une bonne résistance à la rouille foliaire, ce qui est le moyen de lutte principal utilisé contre la rouille causée par *Melampsora larici-populina* (Ginistry *et al.*, 2006 ; Feau *et al.,* 2010). L'homogénéité des cultures entraîne une augmentation de l'impact de certaines maladies. Ainsi, en Amérique du Nord, le chancre septorien causé par *S. musiva* a limité l'expansion de la culture de certains peupliers hybrides, notamment au Canada, qui sont sensibles au chancre (Feau *et al.*, 2005b).

De nombreuses autres maladies ont également attiré l'attention, comme la maladie des taches foliaires causées par deux autres champignons appartenant au genre *Septoria* : *S. populicola* et *S. populi*[6] (Feau *et al.*, 2005b). D'autres maladies ont également été observées sur les peupliers hybrides: les taches des feuilles causées par *Marssonina brunnea*, la brûlure des pousses causée par les espèces du genre *Venturia*, le chancre hypoxylonien causé par *Entoleuca mammata* (Gagné, 2005). Ces émergences s'expliquent par le fait que la majorité des peupliers sélectionnés l'ont été pour leur qualité de production de bois, et qu'au moment de leur sélection, les maladies n'étaient pas ou peu présentes. En plantation de peupliers, lorsqu'ils sont mis en présence de l'agent pathogène, le déploiement du parasite est facilité. En effet, les peupliers sont plus sensibles à cet agent pathogène en plantation car, en forêt, la diversité génétique et la diversité des espèces ligneuses sont plus importantes, et l'agent pathogène a plus de mal à être disséminé (Lepoivre, 2007). L'existence de variétés sauvages résistantes est une source de lutte génétique contre les maladies citées plus haut. Par exemple, en Europe les peupliers présentent une résistance à la rouille de *Melampsora larici-populina* (Ginistry *et al.,* 2006). En effet, de nombreux gènes de résistances sont présents dans les variétés sauvages, et ne sont pas encore contournés par les agents pathogènes. Pour obtenir une variété résistante, il est donc possible de réaliser des croisements entre les variétés hybrides sensibles et les résistantes.

[6] *S. populi* est présent en Europe uniquement (Feau *et al*., 2005b)

Une autre possibilité est d'utiliser des arbres génétiquement modifiés, comportant un gène de résistance aux maladies. Cependant, l'exploitation de tels arbres en plantation n'est pas autorisée actuellement au Canada (Gagné, 2005 ; Ministère des Ressources Naturelles, 2011).

1.3. La maladie septorienne

1.3.1. Spectre d'hôtes

1.3.1.1. Peuplier

Le peuplier est l'hôte principal de *S. musiva*, et le seul hôte connu pour *S. populicola* et *S. populi*. Il faut noter cependant qu'en fonction du cultivar, des résistances plus ou moins importantes à cet agent pathogène ont pu être observées. Ainsi, les cultivars hybrides et exotiques sont les plus sensibles au chancre septorien, contrairement aux espèces indigènes (Ostry et McNabb, 1985 ; Mottet *et al.,* 1991 ; Gagné, 2005). Une récente étude sur *P. balsamifera* a également montré le grand impact du champignon *S. musiva*, dans des plantations composées par des hybrides de ce peuplier, ou uniquement par ce peuplier. En 2006, une haute incidence du chancre septorien a été observée sur *P. balsamifera*, au Nord de l'Alberta dans une plantation située dans la région d'origine de ce peuplier. Cependant, il n'a été rapporté jusqu'à cette étude, aucune forte infection du chancre dans cette région du Canada sur cette espèce de peuplier, qui était considéré jusque là comme résistant à la maladie. L'étude menée par LeBoldus et collaborateurs (2009) ont émis plusieurs hypothèses. La première hypothèse était que l'apparition de la maladie en plantation était liée à une année exceptionnelle, qui a affaibli l'hôte et favorisé l'agent pathogène *S.* musiva. La seconde hypothèse présentée par les auteurs était que l'isolat responsable de l'épidémie en Alberta était dû à un isolat ou un groupe d'isolats plus virulents, capable d'infecter *P. balsamifera.* Ces deux hypothèses ont été réfutées par les auteurs. L'hypothèse d'une année exceptionnelle a été rejetée, car l'âge de la répartition des chancres ne correspondait pas et indiquait une augmentation progressive de l'incidence de la maladie au fil du temps. L'hypothèse des isolats plus virulents a également été rejetée puisque les isolats n'étaient pas plus virulents que les isolats du Québec qu'ils ont utilisé en

comparaison. De plus, aucun cas de chancre n'a été rapporté sur des peupliers de la même espèce en forêt naturelle. Les auteurs ont donc émis deux hypothèses en conclusion qui pourraient expliquer la présence de *S. musiva* sur du *P. balsamifera*. La première est que l'espèce *P. balsamifera* n'a pas une grande importance économique, et la maladie est restée inaperçue au-delà des plantations. L'autre théorie des auteurs est qu'il semblerait que les conditions de développement entre les plantations et la forêt soient différentes, ce qui expliquerait, selon les auteurs, la différence de sensibilité entre *P. balsamifera* et les hybrides dérivés de cette espèce. Dans les deux cas, pour les plantations et les programmes d'amélioration du peuplier, il n'est plus possible de considérer que *P. balsamifera* est un parent résistant au chancre septorien (Leboldus *et al.,* 2009).

Les peupliers de la section *Aigeros* sont plus résistants que ceux de la section *Tacamahaca*, ainsi que de leurs hybrides. Il est également recommandé au Québec par le MRN (Ministère des Ressources Naturelles, 2011) de planter des clones ayant une résistance élevée au chancre septorien. Les clones les moins résistants sont recommandés dans les zones exemptes de la maladie (Bigué *et al.*, 2011).

1.3.1.2. Saule

En 2001, au Québec, il a été observé des taches nécrotiques sur saule (cultivar *Salix lucida* Mühl. Subsp. *lucida*), qui ressemblaient fortement à celles causées par *S. musiva* sur peuplier. Les feuilles infectées présentaient des taches brunes, et des taches nécrotiques. Après comparaison avec des souches de *S. musiva*, et des tests de pathogénicité, il s'est révélé qu'il s'agissait du premier cas de maladie sur saule, causée par ce champignon. Ce qui tendrait à montrer que le spectre d'hôte de ce champignon n'est pas encore connu (Feau et Bernier*,* 2004). A l'heure actuelle, le saule est fourni aux producteurs de bleuets, pour favoriser la pollinisation par les abeilles. Mais, majoritairement la production de saules est encore expérimentale, et des tests sont effectués à travers tout le Canada, par le Service Canadien des Forêts. Ces tests ont pour but d'évaluer des clones sur différents sols et climats, et de déterminer le rendement de production de la biomasse. Un autre but est de promouvoir et démontrer le concept de biomasse aux fermiers et aux propriétaires fonciers (Commission internationale du Peuplier, 2008).

Le saule appartient à la famille des *Salicaceae*, comme le peuplier, et est également une essence à croissance rapide. Ce qui peut expliquer la présence de *S. musiva*. Un saule sur un champ de peupliers, comme plante adventice, sur le sol où se développent les peupliers, peut alors être source de maladies, notamment dans le cas du chancre septorien (Feau *et al.,* 2005a).

1.3.2. Les symptômes

1.3.2.1. Généralités sur la maladie

Le chancre est l'un des deux principaux symptômes présents sur le peuplier, lorsque l'agent causal est *S. musiva*. Il s'agit d'une altération localisée de l'écorce, qui résulte de la réaction du cambium en réponse à un stress abiotique ou biotique. Ici, c'est un stress biotique : l'entrée du champignon dans la plante. Cette réponse de la plante est issue de l'interaction hôte-parasite qui s'établit entre le peuplier et le champignon. Pour cela, il y a mise en présence de l'hôte et de l'agent pathogène. Par conséquent, les paramètres qui interviennent à l'interface de cette rencontre sont primordiaux pour permettre l'établissement ultérieur de l'interaction entre les deux organismes (Lepoivre *et al.,* 1989).

Le second symptôme causé par *S. musiva* se situe au niveau des feuilles. Les spores fongiques se fixent facilement à la cuticule de l'hôte, et restent fixées malgré l'eau et le vent. Le champignon utilise les ouvertures naturelles que constituent les stomates (Luley et McNabb, 1989 ; Feau *et al*., 2010).

Concernant la pénétration au niveau du tronc, *S. musiva* est capable d'entrer par les ouvertures naturelles que constituent les lenticelles, les stipules, les pédicelles des feuilles, mais également à la suite de blessures mécaniques (les machines par exemple) ou des blessures induites par les vents forts et les animaux. Des études ont montré que le mycélium colonise le cambium, et peut dans certain cas atteindre le phloème, le cortex et le périderme (Bier, 1939 ; Zalasky, 1978 ; Weiland et Stanosz, 2007). Dans l'étude de Zalasky (1978), l'auteur montre que le chancre septorien commence par une nécrose des cellules au site initial de l'infection à l'épiderme et au développement de l'épiderme. Cette nécrose atteint le phloème, puisque le champignon se développe de cellule en cellule du

cortex. Une fois le phloème atteint, le champignon change de direction ainsi que la répartition de la nécrose, et ils prennent une direction verticale le long du phloème. Le xylème n'est pas colonisé durant la période de formation des pycnides par le champignon. Zalasky (1978) a également trouvé que le mycélium de *Septoria* est délimité par les veines des feuilles ainsi que par la nervure centrale, et cesse sa croissance lorsque les pycnides sont matures. D'autres études ont également montré la présence du champignon au niveau du xylème (Waterman 1954 ; Krupinsky 1989 ; Stanosz et Stanosz, 2002).

1.3.2.2. Description des symptômes

Septoria musiva

Les symptômes causés par *S. musiva* sont présentés en figure 1.1 (les nécroses sur feuilles) et 1.2 (le chancre septorien).

Figure 1.1 : Taches nécrotiques causées par *Septoria musiva* sur un peuplier

Figure 1.2 : Chancre septorien causé par *Septoria musiva* sur un peuplier hybride

Le champignon se conserve dans la litière des feuilles d'une année à l'autre, pour passer l'hiver. En effet, les pseudothèces apparaissent au niveau des feuilles mortes durant l'hiver, et constituent la source principale d'inoculum des feuilles et branches au printemps suivant (EPPO, 1989).

Le mycélium du champignon pénètre, comme dit plus haut soit au niveau des ouvertures naturelles soit par des blessures. L'agent pathogène semble mieux se développer dans la partie inférieure du tronc et des jeunes tissus succulents. Il semble également que les jeunes pousses favorisent le développement du champignon (Gagné, 2005). Les symptômes observés sur feuilles sont des taches nécrotiques, de tailles variables. Elles sont de couleur brune avec un centre jaune et blanc. Ces taches augmentent rapidement en taille et en nombre. Les pycnides[7] se développent au niveau des feuilles et du chancre. Les spermogonies[8] apparaissent à l'automne à la fois sur les feuilles encore présentes sur l'arbre, mais aussi sur les feuilles mortes, et correspondent au stade sexué du champignon: *Mycosphaerella populorum.* Il faut également noter que ces symptômes sont identiques chez *S. populicola* (*M. populicola*), ce qui rend l'identification de la maladie impossible par la seule observation des symptômes sur feuilles (EPPO, 1989 ; Bigué *et al.,* 2011).

Les symptômes sur tige sont les suivants : coloration des tissus, formation d'une zone nécrosée, déformation de la tige pouvant aboutir à sa mort selon l'agressivité du pathogène. Cela provoque un ralentissement de la croissance de l'arbre, mais également, favorise la colonisation par d'autres organismes opportunistes. L'arbre peut alors se retrouver fragilisé, et cassé par le vent (Gagné, 2005). Il a été noté une perte de biomasse jusqu'à 63% sur les cultivars les plus sensibles (Krupinsky, 1989).

[7] Structure de reproductions asexuées.

[8] Structure contenant des organes sexuels de champignons et lichens, où aucun gamète mâle mobile n'est produit (Feau *et al.*, 2010) .

Septoria populicola

S. populicola cause des taches nécrotiques foliaires sur les peupliers (Figure 1.3). Ces taches sont noires, et présentes sur les deux faces des feuilles. On a même observé sur les peupliers baumiers infectés des défoliations précoces, dans les États de Washington et de l'Oregon aux États-Unis, ainsi qu'en Colombie-Britannique pour le Canada, en 1993 (Newcombe *et al.*, 1995). Ces taches sont généralement petites, et arrondies, et fusionnent pour en former de plus grandes de formes irrégulières (Innes *et al.*, 2006). C'est au niveau de ces taches que se trouvent les pycnides. Ce champignon est capable de produire des taches foliaires ressemblant à celles de *S. musiva*. Il a même été observé la présence de chancre sur le peuplier baumier (Zalasky, 1978), de façon exceptionnelle en serre, par Ostry (données non publiées), bien que Newcombe n'ait pas réussi à obtenir de chancres (Newcombe et Ostry, 2001). Mais ces auteurs avaient utilisé deux isolats différents, ce qui pourrait expliquer cette différence (Newcombe *et al.,* 2001 ; Réseau Ligniculture Québec, 2007).

Figure 1.3 : Taches nécrotiques causées par *Septoria populicola* sur peuplier

1.4. Les agents causaux : *Septoria musiva* et *Septoria populicola*

1.4.1. Biologie des champignons

1.4.1.1. Classification et description

Classification

Les *Septoria* sont des champignons qui provoquent des dégâts sur de nombreuses cultures, comme *S. tritici* et *S. nodorum* responsables de septorioses sur le blé, ou encore *S. populicola, S. populi* sur peuplier, mais aussi *S. musiva*. Il s'agit de champignons terrestres, ayant des hyphes cloisonnés (septa), une paroi composée de chitine, et de spores immobiles spécialisées : les ascospores (reproduction sexuée). Lorsque le champignon se reproduit de façon asexuée, on parle de conidies (Lepoivre, 2007).

La reproduction asexuée chez le champignon est généralement rapide et répétitive, et permet de produire un grand nombre de spores, qui sont toutes génétiquement identiques. Les hyphes sont composés de compartiments cellulaires, dont seules celles situées à l'apex de l'hyphe communiquent entre elles, et sont vivantes. La reproduction sexuée représente généralement la source d'inoculum primaire, et permet aux champignons de se maintenir sous la forme de spores pendant l'hiver. La multiplication végétative représente la source d'inoculum secondaire, et permet aux champignons de se disperser en été (Lepoivre, 2007). La forme téléomorphe (sexuée) de *Septoria musiva* est *Mycosphaerella populorum* Thompson appartenant à l'ordre des Ascomycètes, et *M. populicola* pour *S. populicola* Thompson, et de l'ordre des Dothideales. (Feau *et al.,* 2010). La double nomenclature des champignons vient de l'existence de deux formes différentes de ceux-ci : la forme anamorphe et la forme téléomorphe. Ces deux formes étant différentes morphologiquement, les premières identifications ont donné deux noms pour un même champignon.

Description

S. musiva (Figure 1.4) doit être isolé du chancre, afin de ne pas le confondre avec un autre champignon, *Cytospora chrysosperma*, qui a souvent été isolé. Il possède des pycnides de couleur brun-noir, plutôt globuleuses, ou plates, d'une largeur de 45 à 105 µm. Les conidies sont transparentes, cylindriques, droites ou légèrement courbées. Les spermogonies sont noires et globuleuses. Les asques sont cylindriques, raides, d'une taille de 51-73 × 12-17 µm. Les ascospores sont transparentes, avec un septum, et de taille 17-24 × 3-6 µm (EPPO, 1989).

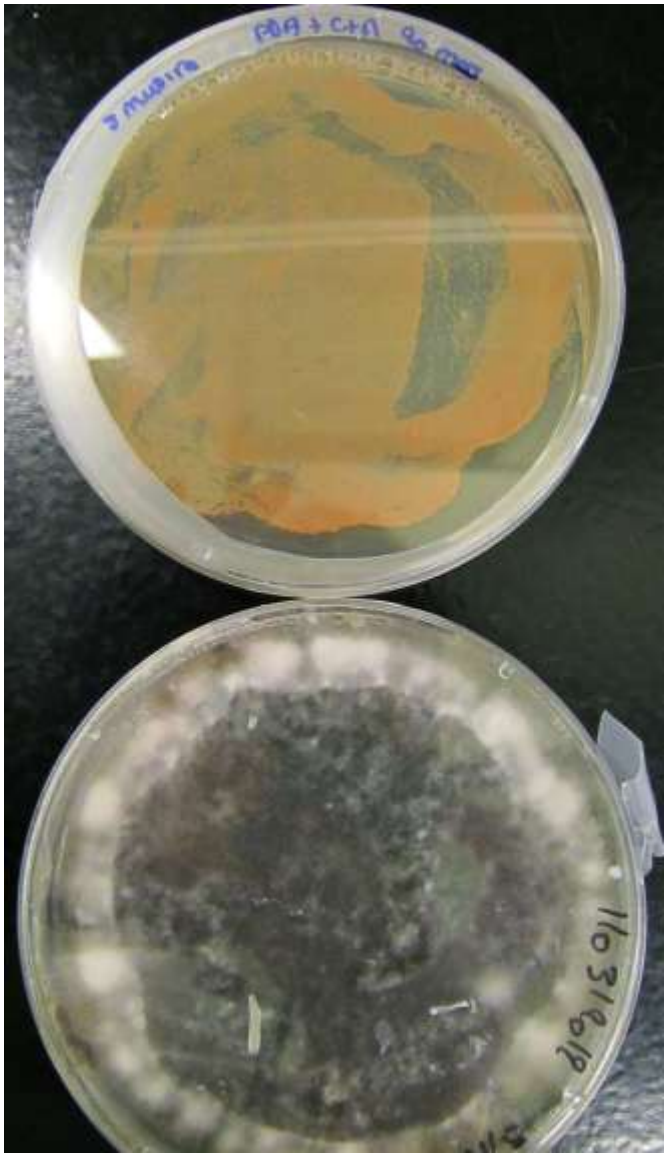


Figure 1.4 : *Septoria musiva* (souche so2202) sur *PDA* (en haut), et sur *Cereal mix medium* (en bas)

Les ascospores issues de la reproduction sexuée sont responsables de l'inoculum primaire dans le chancre septorien (Ostry, 1987; Luley et McNabb, 1989). Actuellement, une source additionnelle de l'inoculum provenant de conidies libérées du mycélium ayant passé l'hiver dans l'arbre ou les feuilles mortes reste hypothétique (Ostry, 1987 ; Luley et McNabb, 1989 ; Feau *et al.*, 2010). La forme téléomorphe (*M. populorum*) débute à l'automne sur les feuilles tombées, par la formation de thalles diploïdes qui donnent lieu à

des fructifications sexuées (pseudothèces) au printemps. Les spermogonies semblent être présentes à l'état de sénescence, pendant la période végétative (Feau *et al.*, 2010).

Figure 1.5 : *Septoria populicola* (souche 02165A) sur *PDA*

S. populicola (Figure 1.5), quant à lui, possède des ascospores qui ont 2 à 5 septa, et de taille 45–80×3–4 µm. Il est cependant difficile de le distinguer de *S. musiva* par identification de pseudothèces, en raison de la difficulté à trouver la forme téléomorphe. De

plus, morphologiquement parlant, ces deux espèces se ressemblent. Il est donc difficile de les différencier visuellement, et seule une analyse par marqueurs moléculaires le permet (Feau *et al.,* 2005b).

1.4.1.2. Modes de reproduction

C'est dans le pseudothèce que sont produites les ascospores. Expérimentalement, il a été possible de former des spermogonies, qui sont bien distinctes structurellement des pseudothèces. Ces spermogonies ont été obtenues de façon expérimentale en mettant en contact un inoculum de spermogonies avec une culture de *S. musiva*. Cependant, le mécansime exact par lequel les spermogonies induisent la formation de pseudothèces n'a pas encore été déterminé (Luley *et al.*, 1987 ; Feau *et al.,* 2010).

1.4.2. Aire de répartition

1.4.2.1. Dans le monde

En Europe, aucun cas de chancre septorien n'a pour le moment été répertorié, malgré l'utilisation de peupliers hybrides sensibles à la maladie. Cela est dû à l'absence de *S. musiva* sur le sol européen, exceptée dans la Péninsule criméenne. Des cas de chancres septoriens ont été rapportés en Asie, dans la région du Caucase (FAO, 1999). Il semble cependant que la maladie soit principalement à l'état endémique en Amérique du Nord (Feau *et al.*, 2010). *S. populicola* semble également être présent uniquement en Amérique du Nord, bien que des cas de septoriose aient été signalés en Afrique du Sud (FAO, 1999).

1.4.2.2. Amérique du Nord

Plusieurs sources révèlent la présence de *S. musiva* aux États-Unis, notamment dans l'État du Wisconsin, et plus généralement dans le centre nord des *USA*. Il se trouve également au Canada, dans la province du Québec, et dans la province de l'Ontario. Récemment, une étude a révélé la présence du champignon en Alberta, en 2006, ainsi qu'en Colombie Britannique, dans la vallée du Fraser (Callan *et al.*, 2007 ; Leboldus *et al.,* 2009 ; Feau *et al.*, 2010).

Dans la province de Québec, le champignon a d'abord été confiné aux régions bioclimatiques 1 (zone de l'érablière à caryer cordiforme et érablière laurentienne) et 2 (érablière à bouleau jaune) (Robitaille et Saucier, 1998). En 2000, les premiers cas de chancres septoriens ont été découverts dans la zone bioclimatique 3, région du Témiscamingue. Il a également été détecté en 2004, au Lac-Saint-Jean, qui forme le domaine bioclimatique 4, puis en a été éradiqué avec succès (Mottet *et al.*, 2007 ; Feau *et al.*, 2010). Il s'agit de la maladie qui provoque le plus de dégâts dans le Sud de la province, au niveau des plantations de peupliers. Le champignon est peu présent dans les forêts, où il ne pose que des problèmes mineurs. Il semble cependant pour le moment absent dans le domaine de la sapinière à bouleaux blancs, les conditions de son développement étant probablement limitées par les conditions bioclimatiques de la région (Gagné, 2005).

Cette répartition de la maladie est directement liée à l'expansion de la populiculture dans ces régions, depuis les années 1970 (Feau *et al.*, 2005b). Cette expansion est directement liée à l'utilisation de cultivars productifs, mais également sensibles à la maladie. C'est le cas pour les peupliers appartenant à la section *Tacamahaca*, qui sont utilisés au Québec, qui se révèlent très sensibles à la maladie, alors que les peupliers de la section *Aigeros* sont plus résistants, mais moins productifs. Il semble également qu'une expansion de la maladie soit possible, en raison des changements climatiques (Gagné, 2005).

S. populicola est présent dans toute l'Amérique du Nord, et plus fréquemment dans la région Nord-Ouest, où une épidémie a été observée il y a une vingtaine d'années (Newcombe *et al.*, 1995). Il apparaît cependant que l'espèce soit peu virulente pour le moment sur les hybrides de peupliers ayant *P. deltoides* comme l'un des deux parents. Il semble également présent sur *P. trichocharpa* et ses hybrides dans le Nord-Ouest de l'Amérique, mais le champignon n'entraîne pas de dommages importants (Gagné, 2005).

1.4.2.3. Amérique du Sud

Des cas de chancres septoriens ont été rapportés sur des peupleraies, notamment en Argentine. Ceci s'est révélé sur des hybrides obtenus par croisement entre des peupliers

américains et européens (Sivanesan 1990 ; Feau *et al*., 2010). La présence du champignon a été également rapportée en 2010 au Brésil, mais il paraît absent dans les autres pays (Feau *et al.*, 2010 ; Santos *et al.,* 2010).

1.4.3. Diversité et évolution du champignon

1.4.3.1. Diversité de la population fongique

Concernant la diversité génétique de *S. musiva*, Feau *et al*. (2005a) ont montré que les sous-populations qui ont été échantillonnées sur du *P. deltoides*, et sur des peupliers hybrides dans une même aire géographique étaient génétiquement liées. Les sous-populations étaient également génétiquement liées lorsqu'elles provenaient des chancres et des taches foliaires. Ils ont également démontré une évolution génétique au sein de la population de Saint-Ours, entre 2001 et 2002. Cependant, ils attribuent cette évolution à une différence de fréquences entre les marqueurs utilisés. La comparaison entre les populations septoriennes de l'état du Wisconsin (*USA*) et de la province du Québec a montré que ces deux populations se distinguent par trois marqueurs : $OPJ8_{4200}$, $OPJ8_{1600}$ et $OPK2_{2950}$. Feau et collaborateurs (2005a) ont montré également une diversité entre les populations du Wisconsin, de la province de l'Ontario, et de celle du Québec. Sur l'ensemble de leurs échantillons, les auteurs ont pu identifier 88% environ d'haplotypes uniques, et seulement deux étaient identiques : l'un entre l'Ontario et le Wisconsin, et le second entre le Québec et le Wisconsin. Lorsque des haplotypes étaient identiques, Feau et collaborateurs (2005a) ont montré qu'ils provenaient d'arbres proches géographiquement (distance inférieure à trois km). Ceci prouverait que les conidies sont dispersées majoritairement par le phénomène du *rain-splash*[9]. Les auteurs ont également pu démontrer une diversité génétique liée à une adaptation locale de ces sous-populations.

[9] Il s'agit d'éclaboussures d'eau soit de pluies, soit de rosée.

1.4.3.2. Évolution de *S. musiva* à court terme

L'utilisation par le passé de plantes de cultures résistantes à un agent pathogène, comme une bactérie ou un champignon, a provoqué un phénomène de sélection, aboutissant à l'émergence d'agents pathogènes capables de contourner cette résistance. L'utilisation de traitements chimiques a également vu apparaitre des souches résistantes à ces produits (Lepoivre, 2007). Comme nous venons de le voir, *S. musiva* possède une variabilité génétique entre population de régions différentes, mais également au sein d'une même région (Feau *et al.,* 2005a). Actuellement, toutes les documentations révèlent que les hybrides de peupliers utilisés en populiculture sont tolérants à *S. musiva* (Feau *et al.*, 2005a ; Feau *et al.,* 2010). On peut donc s'attendre à court terme, par l'utilisation cultivars résistants et de produits chimiques, à ce que *S. musiva* soit plus virulent, et à une attaque des cultivars dits résistants.

1.5. Moyens de lutte contre la maladie

Il ne semble pas exister de moyens de lutte contre les taches foliaires causées par *S. populicola*, d'autant plus que les hybrides utilisés au Québec semblent être résistants (Gagné, 2005).

De nombreux moyens de lutte sont actuellement à l'étude contre le chancre septorien. Nous allons en voir ici trois: la lutte biologique, la lutte chimique, et la lutte génétique.

1.5.1. Lutte biologique

Cette technique consiste à utiliser des micro-organismes qui vont empêcher le développement du champignon. Ainsi, on peut utiliser des champignons prédateurs d'autres champignons, ou qui vont produire un antibiotique tueur du champignon concerné, ou encore des micro-organismes capables de provoquer le système de défense de la plante (Lepoivre, 2007). C'est le cas du champignon *Phaeotheca dimorphospora* dont l'activité antibiotique permet de lutter contre de nombreux pathogènes, notamment *S. musiva,* à l'échelle expérimentale. Des tests ont permis de montrer en serre, et en culture *in vitro* une nette réduction du développement de la maladie. Cependant, cette technique ne peut être

encore utilisée en champs, sans avoir subi une batterie d'autres tests, notamment déterminer s'il s'agit d'un moyen de lutte suffisant pour protéger les peupliers hybrides contre le chancre septorien (Yang *et al.,* 1994).

Des bactéries ont également été étudiées pour lutter contre la maladie du chancre septorien. C'est le cas de *Streptomyces*, qui a montré une inhibition du développement de *S. musiva*, ainsi qu'une nette diminution des taches nécrotiques, voire une diminution importante de la défoliation. Cependant, il n'y a aucune assurance que ce traitement puisse éviter l'apparition de la maladie en peupleraie (Gyenis *et al.,* 2003).

1.5.2. Lutte chimique

La lutte chimique consiste à utiliser des molécules d'origine naturelle, ou de synthèse afin d'inhiber la croissance du champignon, ou son développement (Lepoivre, 2007). Actuellement, la lutte chimique reste coûteuse, et peu efficace sur le long terme contre *S. musiva*. Les fongicides sont écologiquement décriés, et ne constituent pas une solution réalisable, dans le cadre d'une culture intensive de peupliers hybrides. Mais dans le cas d'une lutte de réduction de la propagation de la maladie en peupleraies sur le court terme, ils se révèlent très efficaces (Feau *et al.*, 2010). Il existe quelques fongicides qui ont été testés sur *S. musiva*, dont deux principaux: le captafol, et un fongicide contenant du benomyl. Ils se sont révélés efficaces sur le court terme pour réduire l'impact de la maladie, mais sur le long terme, les plantations traitées étaient quand même touchées par la maladie (Ostry et McNabb*,* 1983).

1.5.3. Lutte génétique

À ce niveau, il existe deux types de lutte : la première consiste à sélectionner des cultivars résistants à la maladie, et la seconde à insérer des gènes produisant des protéines anti-microbiennes.

1.5.3.1. Les peupliers hybrides résistants

Il s'agit d'utiliser des peupliers hybrides, ayant une résistance « naturelle » à la maladie septorienne. Actuellement, il semble que cette stratégie soit la seule efficace pour

lutter contre la propagation de la maladie en plantation (Feau *et al.*, 2010). En effet, une étude sur la variabilité d'agressivité de *S. musiva* a démontré des degrés d'agressivité distincts entre différents inoculums et différents clones. L'agressivité pouvait varier au sein d'une même région, mais aussi la réponse au niveau de l'hôte (Krupinsky, 1989). L'hôte peut avoir principalement deux types de résistance qui vont influer sur le niveau de réponse de celui-ci à l'infection: la résistance verticale, et la résistance horizontale.

La résistance verticale

La résistance verticale est également appelée résistance totale. Il s'agit d'une forme de résistance basée sur la reconnaissance ou non d'effecteurs. Elle est directement liée au couple hôte-pathogène, c'est une réaction spécifique. La résistance *HR* (*Hypersensitive Reaction*) est une réaction d'hypersensibilité de la plante. Elle se traduit par une réponse de la plante qui correspond à la mort de la première cellule infectée par l'agent pathogène, afin d'empêcher son développement. Ceci entraine l'apparition de petites taches nécrotiques, correspondant à la mort des cellules infectées. Cette réaction aboutit à une relation incompatible entre l'hôte et les biotypes d'un agent pathogène avirulent, et permet dans le cas d'un agent biotrophe[10] de stopper sa propagation. Elle existe également chez une espèce végétale non hôte. Ce mécanisme est directement lié au phénomène de résistance acquise (*Systemic Acquired Resistance* (*SAR*)). La pénétration de l'agent pathogène dans la plante non hôte, ou résistante provoque dans les cellules végétales infectées la formation d'oxygène actif, qui met les cellules en choc respiratoire, et provoque leur mort cellulaire. Ce choc respiratoire est ensuite suivi par des mécanismes de défenses des cellules voisines qui diffusent un signal, la *SAR*. Ainsi, lors d'une seconde inoculation, à un autre endroit de la plante par le même agent, les symptômes sont moins intenses. Ceci est corrélé à des molécules qui permettent de maintenir les cellules en état de prévention contre la maladie.

[10] « Modalité de nutrition qui exige une cellule vivante et métaboliquement active comme source d'éléments nutritifs » (Lepoivre, 2007).

Dès lors que l'agent pathogène est capable de surmonter cette résistance, il est dit virulent à l'égard de la variété correspondante (Lepoivre, 2007).

La résistance verticale est généralement monogénique ou oligogénique[11]. Dans le cas de cette résistance, For a formulé le principe du « gène pour gène ». Ce principe postule que chaque gène de résistance de l'hôte correspond à un gène d'avirulence du parasite. L'association d'une variété possédant un gène de résistance avec un biotype parasite possédant le gène d'avirulence corespond à une relation incompatible. Les allèles de résistances de l'hôte et d'avirulence de l'agent pathogène sont généralement dominants. Cependant, il arrive dans la pratique que certains individus montrent une résistance verticale absolue, et d'autres une resistance verticale partielle. Certains gènes de résistance verticale pouvant s'exprimer très tôt dans l'infection alors que d'autres sont plus tardifs (Lepoivre, 2007).

Cependant, lorsqu'un cultivar est mis au champ avec une résistance verticale, celle-ci reste totale dans les premiers temps. L'extension de la variété résistante sur de grandes surfaces va augmenter la probabilité de sélection d'un biotype virulent. Cette sélection du biotype virulent de l'agent pathogène provoque une perte de résistance progressive, qui correspond à un écroulement de la résistance spécifique. Quand cette résistance est contournée par l'agent pathogène, il est possible d'introduire un nouveau gène de résistance vis-à-vis du ou des nouveaux biotypes virulents dominants. Il peut y avoir un cumul de gènes de résitance spécifiques chez l'hôte, et la sélection d'un nouveau biotype virulent. Les biotypes porteurs de telles accumulations de gènes de virulence ont un potentiel épidémique réduit sur les cultivars dépourvus des gènes de résistance correspondants (Lepoivre, 2007).

Il arrive également que certains individus aient une résistance verticale absolue, et d'autres présentent une résistance verticale partielle. Ceci est lié au moment où s'exprime le

[11] Oligogénique : déterminés par un seul gène ou un nombre réduit de gènes (Lepoivre *et al.*, 2007).

gène de résistance. Certains gènes s'expriment très tôt dans l'infection, alors que d'autres sont beaucoup plus tardifs. Cette expression tardive peut même survenir lorsqu'il y a eu sporulation, c'est le cas notamment du mildiou de la laitue. Les gènes de résistance peuvent être divisés en deux types de gènes : fort et faible. Les gènes forts sont des gènes de résistance pour lesquels les biotypes virulents correspondants ne sont pas aptes à survivre sur les plantes dépourvues de ces gènes et sont donc éliminés en même temps que les cultivars sensibles. Si c'est un gène de résistance faible, les biotypes correspondants sont très compétitifs et peuvent se maintenir sur des variétés dépourvues du gène de résistance ou même d'autres espèces végétales (Lepoivre, 2007).

La résistance horizontale

La résistance horizontale est un mécanisme mal connu. Elle est également appelée résistance partielle. La plante va présenter des symptômes plus ou moins importants en fonction de sa résistance. Cela va varier selon les cultivars, et le degré d'agressivité de l'agent pathogène. Cela est dû au fait que cette résistance est liée à un ensemble de gènes de résistance. Mais, il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'une résistance durable dans le temps, puisqu'il n'y a aucune sélection d'un agent pathogène par rapport à un autre (Lepoivre, 2007).

La résistane horizontale est une résistance générale, c'est-à-dire que c'est une résistance partielle identique vis-à-vis de tous les biotypes d'un agent pathogène. Le niveau d'agressivité de l'agent pathogène varie en fonction des cultivars, puisque le parasite présentera une agressivité différente selon les cultivars (Lepoivre, 2007).

La résistance horizontale est le plus souvent polygénétique, mais il existe des cas où elle est monogénique. Ceci peut être le cas lorsque la plante hôte présente une insensibilité à une pathotoxine secrétée par l'ensemble des souches du parasite (Lepoivre, 2007).

Cette résistance intervient, tout comme pour la résistance verticale, à des niveaux différents des étapes de l'infection. Cette résistance s'exprime également grâce à un ensemble d'allèles dominants ou récessifs qui interagissent avec d'autres gènes : modificateurs, épistatiques, mais aussi avec les conditions du milieu. Pour déterminer si la

plante présente une résistance horizontale, il est nécessaire de prendre la mesure des composantes particulières du cycle infectieux de base quand la plante est infectée par plusieurs isolats du parasite. En effet, la réaction de résistance de la plante, comme dit plus tôt, est fonction de l'agressivité de l'agent pathogène et des gènes de résistance. La résistance horizontale est d'ailleurs généralement considérée comme durable, puisqu'elle n'exerce aucune ou peu de pression de sélection sur les différents biotypes de l'agent pathogène, contrairement à la résistance verticale (Lepoivre, 2007).

Application aux peupliers

Feau *et al*. (2010) citent l'exemple de la maladie sur peuplier causée par *Melampsora larici-populina*, où la principale technique de lutte est la sélection et l'utilisation de matériel végétal résistant, lié à la résistance verticale. Mais cela a provoqué la sélection de races capable de contourner ce mécanisme. Il est donc important d'incorporer une résistance complexe qui mélange une résistance horizontale et une verticale.

Actuellement, au Québec, la sélection de peupliers résistants au chancre septorien est une étape importante pour la sélection clonale et la stratégie d'amélioration des peupliers. Cette stratégie consiste à utiliser des clones non apparentés et sans résistances totales à la maladie, afin d'avoir une résistance durable (Périnet, 1999). Ainsi, les améliorateurs maintiennent une haute diversité génétique en produisant différentes lignées d'hybrides, de différentes familles. Pour cela, ils utilisent majoritairement cinq espèces : *P. deltoides* (D) et *P. balsamifera* (B) qui sont deux espèces indigènes, et trois espèces exotiques : *P. maximoviczii* (M), *P. nigra* (N) et *P. trichocarpa* (T) (Feau, *et al.*, 2010). Parmi ces cinq espèces, quatre sont naturellement résistantes à *S. musiva* : *P. deltoides*, *P. balsamifera, P. trichocarpa* et *P. nigra*. Mais, les hybrides qui ont été obtenus à partir de ces génotypes ont montré des résistances variables selon les clones (Mottet *et al.*, 1991 ; Gagné, 2005 ; EPPO, 1989). D'autres espèces ont été rapportées comme étant résistantes, soit *P. alba*, *P. canescens* et *P. nigra* var. *italica* (EPPO, 1989).

Les hybrides obtenus à partir de l'espèce exotique *P. maximoviczii*, avec les quatre autres espèces (D, B, N et T) ont montré une bonne résistance aux insectes et aux maladies, excepté pour la résistance au chancre septorien. Les 18 clones utilisés dans le sud de la

province, obtenus par hybridation entre ces cinq espèces (hybrides DN, TD, DN×M, NM et MB) montrent un bon niveau de résistance au chancre septorien, et cette résistance est entretenue en renouvelant les hybrides (Feau *et al.*, 2010).

Autres types de résistance du peuplier

Il existe deux autres types de résistances susceptibles d'être utilisées chez le peuplier : la résistance adaptative, et la résistance non adaptative. La résistance adaptative est liée à la co-évolution locale entre l'agent pathogène et l'hôte dirigée par une pression de sélection opérant entre les populations des pathogènes et des plantes hôtes. Les peupliers de l'Est de l'Amérique du Nord, appartenant à l'espèce *P. deltoides* sont résistants au chancre septorien (Ostry et McNabb, 1985 ; Newcombe et Ostry, 2001) et représentent une source utilisable de la résistance adaptative (Newcombe, 1998 ; Feau, *et al.*, 2010). Par contraste, les provenances exotiques appartenant à la section *Tacamahaca*, comme *P. trichocharpa* (indigène à la côte Ouest de l'Amérique du Nord), et l'espèce asiatique *P. maximowiczii*, montrent généralement une faible résistance au chancre septorien. Similairement, les hybrides issus du croisement entre *P. deltoides* et du peuplier baumier de la section *Tacamahaca* sont particulièrement sensibles au chancre (Ostry et McNabb, 1985 ; Newcombe et Ostry, 2001 ; Feau *et al.*, 2010). La résistance adaptative concerne l'espèce *P. deltoides*. Une étude menée par Ostry et McNabb (2001) sur cette résistance a démontré que le gène impliqué est récessif. Ceci explique pourquoi les hybrides obtenus avec *P. deltoides* comme l'un des parents sont sensibles à la maladie. Seuls les hybrides récessifs, qui sont en proportions inférieures, peuvent exprimer cette résistance.

La seconde résistance (non adaptative) est la base de la seconde source de résistance exploitable d'espèces de peupliers d'Amérique du Nord. Cette résistance est due à l'absence d'une histoire co-évolutive partagée entre l'hôte (le peuplier) et le pathogène (*S. musiva*). L'incompatibilité qui se créé entre l'hôte et son parasite peut être due à une forte adaptation locale du parasite à son hôte (Newcombe, 1998). Cette résistance a été identifiée dans le pathosystème de *Populus-Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae* Shain, sur la descendance d'hybrides issus du croisement entre *P. deltoides* et *P. trichocharpa*. La résistance à cette rouille, indigène de l'Amérique du Nord-Est, est contrôlée par l'allèle

Mmd1 hérité de *P. trichocharpa* (Newcombe, 1998). Ce type de résistance est évidente puisque *P. trichocharpa* et *M. medusae* f. sp. *deltoidae* ne présentent aucun indice de co-évolution. De nombreuses autres résistances non adaptatives ont été identifiées chez le peuplier, comme la résistance observée pour les champignons phytopathogènes *M. larici-populina*, *M. occidentalis* et *Venturia populina* Fabric (Newcombe, 1998). Un seul exemple est pour le moment connu pour le chancre septorien. Il s'agit de l'espèce européenne *P. nigra.* Cependant, aucune étude n'a été menée pour déterminer s'il s'agit d'une résistance fixée, ou non (Newcombe, 1998 ; Newcombe et Ostry, 2001 ; Feau *et al.*, 2010). L'espèce *P. nigra* pure est considérée comme étant modérément sensible suite aux tests effectués aux champs et à l'inoculation de 21 provenances européennes (Mottet *et al.*, 1991 ; Feau, *et al.*, 2010).

1.5.3.2. Les peupliers génétiquement modifiés

Il s'agit de créer des peupliers génétiquement modifiés, qui sont par exemple capables de produire des peptides anti-microbiens contre le chancre septorien ou encore de produire une enzyme permettant la formation d'eau oxygénée, impliquée dans la réaction *HR*. Pour cela, il faut d'abord évaluer l'activité antifongique, et la toxicité des molécules sélectionnées, afin d'identifier les gènes candidats pour la transformation des peupliers. Une expérience a été conduite avec un antifongique combiné à un peptidyle MIM©, et les peupliers transformés ont montré une nette résistance au chancre septorien. Cependant, cette étude a été conduite sur une seule souche de *S. musiva*, et la variabilité du champignon n'a pas été prise en compte (Jacobi *et al.*, 2000 ; Feau *et al.*, 2010).

Une autre transformation génétique des peupliers a également montré une bonne résistance *in vitro* à la maladie. Cette transformation utilisait des gènes synthétisant des protéines anti-microbiennes (Liang *et al.,* 2002). Une autre expérience de transformation a également été réalisée avec l'introduction d'une oxydase oxalate, et présentant une résistance supérieure au témoin (Liang *et al.,* 2001). Des risques liés à ces arbres génétiquement modifiés ont été évalués en essai en conditions confinées au Canada en 2009 (Ministère des Ressources Naturelles, 2011). Ces risques sont notamment liés à la dispersion des gènes qui sont introduits dans l'arbre. Cela peut se produire soit par les semences et le pollen, soit par la chute des feuilles à l'automne, avec un risque de transfert

des gènes aux micro-organismes du sol. Cela aboutirait sur le long terme à l'apparition de nouvelles espèces résistantes, et donc plus agressives, que ce soit au niveau des agents pathogènes ou des insectes. Il y a également un risque de voir les arbres génétiquement modifiés envahir les forêts naturelles, et se comporter comme des espèces nuisibles (Ministère des Ressources Naturelles, 2011). Un autre problème est le manque d'informations sur les risques qu'apportent ces arbres aux populations fongiques non visées par la résistance insérée dans les arbres et non pathogènes, comme les champignons mycorhiziens. Ces risques doivent donc être évalués avant de mettre de tels arbres en plantation (Stefani et Hamelin, 2010).

Un problème se pose également au niveau de l'obtention du phénotype désiré. En effet, ce phénotype peut ne pas être obtenu, comme par exemple dans le cas d'une résistance à une maladie. Dans l'article de Stefani et Hamelin (2010), deux études sont notamment citées sur l'utilisation de peupliers génétiquement modifiés pour lutter contre le chancre septorien. La première utilisait un gène *bacterio-opsin* sur deux peupliers hybrides, dans le but d'améliorer leur réponse hypersensible. La surexpression de ce gène chez ces deux hybrides de peuplier a résulté en une sensibilité accrue aux pathogènes fongiques qui ont été testés en serre, notamment *S. musiva* et *S. populicola*. Lors de cette même expérience, le taux de croissance de l'un des deux hybrides a été sévèrement affecté (Mohamed *et al.,* 2001). Cela montre, d'après Stefani et Hamelin (2010) que de nombreuses mutations sont préjudiciables, et que le phénotype peut être imprévisible. La seconde étude citée par ces mêmes auteurs, à propos de *S. musiva,* montre que pour un même gène, le résultat obtenu diffère d'un clone de peuplier hybride à l'autre. Le gène ESF12 utilisé a été testé avec succès sur le clone Ogy (*Populus × euramericana*) et a permis d'améliorer la résistance au chancre septorien. Mais ce même gène testé sur un autre clone NM6 (*P. nigra × P. maximovizii*) n'a pas apporté la résistance escomptée. En effet, ce clone s'est révélé aussi sensible que le témoin au chancre septorien (Liang *et al.,* 2002). Ceci montre, d'après Stefani et Hamelin (2010), que la position génomique du transgène joue un rôle majeur dans le génome receveur sur le succès du caractère nouveau. Qui plus est, l'utilisation de peupliers génétiquement modifiés n'est pour le moment pas encore autorisée au Canada (Gagné, 2005 ; Ministère des Ressources Naturelle, 2011).

1.6. La transformation par *Agrobacterium tumefaciens* : un outil pour la génomique fonctionnelle des champignons

1.6.1. Généralités sur la génomique fonctionnelle

Le séquençage de génomes de divers organismes a permis d'accéder au message de base : l'ADN. Mais, encore faut-il pouvoir associer une fonction à un gène. Pour cela, différentes méthodologies ont été mises en place au cours des 70 dernières années, afin de permettre l'association entre un gène et un phénotype. C'est ce que l'on appelle la génétique. Avec l'avancée technologique, il a été possible d'étudier la génomique des organismes, c'est-à-dire l'étude systématique du génome en utilisant le séquençage de l'ADN, l'analyse de l'expression des gènes et des modélisations par ordinateur (Hartl et Jones, 2003). Ce qui était à la base « l'étude de la structure, du contenu et de l'évolution des génomes, en s'appuyant sur les résultats du séquençage de séquences nucléotidiques », s'est perfectionnée. Ainsi, des sous-domaines de la génomique sont apparus : la génomique structurale, et la génomique fonctionnelle (Jaspard, consulté le 25 octobre 2012 ; Hartl et Jones, 2003).

Pour déterminer la fonction de ce gène, la génomique fonctionnelle se base sur différentes approches. Le premier est de définir la localisation spatiale et temporelle de l'expression d'un gène, pour savoir à quel moment un gène est transcrit en ARN, et où celui-ci est transcrit. En effet, chez tous les organismes, tous les gènes ne s'expriment pas en même temps, mais sont régulés par des régions spécialisées. Le deuxième but est de définir les interactions du produit des gènes avec d'autres produits de gènes, ou encore d'autres molécules. Le dernier but est de définir le rôle du produit de gènes à l'étude dans la voie métabolique et/ou de sa ou ses voies de régulation (Jaspard, consulté le 25 octobre 2012 ; Hartl et Jones, 2003). Pour répondre à ces différents objectifs, des méthodes ont été mises en place. L'approche par les mutations est le matériel primaire indispensable à l'analyse génétique. La méthode la plus courante est d'isoler un phénotype mutant pour mettre en évidence un gène mutant. Ceci permet d'étudier l'allèle sauvage du gène et sa fonction d'origine. Cependant, cette approche connaît également ses limites, puisque cette technique est inefficace pour isoler des mutations dans des gènes dont la fonction est

redondante à celle d'un second gène, ou qui sont essentiels pour la viabilité d'un organisme (Hartl et Jones, 2003 ; Michielse *et al.*, 2005).

Une des techniques les plus couramment utilisées pour déterminer la fonction putative d'un gène est d'éteindre spécifiquement le gène d'intérêt par mutagenèse dirigée, grâce à l'ADN recombinant. Le principe consiste à cloner le gène sauvage, puis y introduire une mutation. Ces gènes mutés sont ré-introduits ensuite dans l'organisme pour étudier leurs effets sur le phénotype (Hartl et Jones, 2003 ; Michielse *et al.*, 2005). Cette technique repose sur une des caractéristiques de l'ADN : la recombinaison homologue. Mais, avant cette étape d'insertion dans le gène, il est possible de passer par une étape de recombinaison non homologue, ou transformation aléatoire, qui a été utilisée longtemps en routine. Ceci afin de vérifier que l'organisme était transformable. Lorsque cette première étape est effectuée, il est possible d'envisager alors la mise en place d'un système de transformation qui va cibler des gènes précis. Ceci a été utilisé sur de nombreux champignons filamenteux comme *Aspergillus nidulans* (Balhadère *et al.,* 1999)*, Botrytis cinerea* (Shoonbeeck *et al.*, 2001)*, Fusarium oxysporum* (Hua-Van *et al.,* 1998 ; Mullins *et al.,* 2001), *Magnaporthe grisea* (Sweigard *et al.*, 1998 ; Villaba *et al.*, 2001), *Ustilago maidis* (Bölker *et al.*, 1995)*,* mais également chez les plantes et les animaux. De nombreux systèmes d'intégration ont été utilisés, ici une liste non exhaustive de ces techniques est citée : le système *REMI* (*Restriction Enzyme Mediated Integration*), le polyéthylène glycol couplé au $CaCl_2$, l'électroporation, le bombardement à particules, ou encore la transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* (Islam *et al*., 2012).

Des techniques de désactivation de gènes sont également utilisables pour étudier la fonction d'un gène. Ici, je ne cite que deux techniques qui sont couramment utilisées en laboratoire. La première est l'utilisation des transposons comme technique de mutation, qui sont capables de s'insérer dans le génome grâce à des fonctions qui leurs sont propres. L'avantage est qu'ils sont capables de se déplacer dans le génome par eux-mêmes. La seconde technique est celle des *RNA interference* (*RNAi*). Cette fois-ci, la désactivation se fait au niveau de l'ARNm, et non plus au niveau de l'ADN (Tagu et Moussard, 2003).

La technique utilisant *A. tumefaciens* a un avantage sur les autres méthodes, puisqu'elle peut facilement transformer des souches fongiques, même les espèces qui ne sont pas transformables par les techniques citées plus haut. Elle peut ainsi transformer les champignons par recombinaison non homologue et l'insertion d'ADN-T (ADN de transfert) en des sites aléatoires, en une seule copie. Mais elle peut également augmenter la fréquence des recombinaisons homologues, permettant ainsi son utilisation dans les désactivations ciblées de gènes (Islam *et al*., 2012).

1.6.2. Transformation avec *Agrobacterium tumefaciens*

1.6.2.1. La bactérie

Agrobacterium tumefaciens est un bacille gram négatif. Cette bactérie appartient à la famille *Rhizobiaceae,* tout comme *Agrobacterium rhizogenes*. Il s'agit de bactéries présentes dans le sol, qui sont pathogènes des plantes. La première est responsable de la galle du collet, la seconde de la maladie « *hairy root »*, qui est une maladie sur racine (Lepoivre, 2007).

A. tumefaciens a la particularité d'utiliser la machinerie cellulaire de la plante à son avantage. Elle est capable de transférer une partie de son ADN, appelé ADN-T (pour ADN de transfert), dans la cellule végétale. Cet ADN-T est situé sur le plasmide inducteur de tumeur, appelé plasmide *Ti* (pour *Tumor inducing*), qui a une taille variable (McClelland et Wickes, 2009). La région ADN-T possède, quant à elle, une taille comprise entre 13 et 30 kb. Les cellules de la plante présentes dans la région d'une blessure vont produire des sucres et des composés phénoliques, comme l'acétosyringone et l'acide syringique, en réponse à cette blessure. C'est l'acétosyringone qui va attirer la bactérie (Lepoivre, 2007), mais également qui va lui permettre d'enclencher son mécanisme de transfert de l'ADN dans le noyau cellulaire. L'ADN-T qui est transféré possède naturellement des gènes qui encodent des enzymes qui régulent la production de régulateurs de croissance de la plante. Ceux-ci vont alors être sur-exprimés, résultant en une croissance incontrôlée des cellules de la plante. Il finit par y avoir la formation d'une galle, appelée également *crown gall*. Il s'agit en fait d'une boule présente au niveau du collet de la plante (Figure 1.6) (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

Figure 1.6 : Galle du collet sur *Euonymus* causée par *Agrobacterium tumefaciens* (en haut, vue de la bactérie en microscopie électronique), source: www.apsnet.org

Le plasmide *Ti* contient également des régions qui sont appelées régions de virulence. Ces régions sont composées de gènes *vir*, qui sont des gènes nécessaires à la formation et au développement de la tumeur dans la plante (Zhu *et al.,* 2000 ; Zupan *et al.*, 2000). Les protéines encodées par cette région semblent être impliquées dans la formation, le transport, et l'intégration de l'ADN-T dans le noyau de la cellule végétale (Hooykaas et Beijersbergen, 1994 ; Zhu *et al.* 2000). La région de transfert du plasmide *Ti* est entourée de régions répétées d'environ 24 pb, appelée signal *cis-actif* pour délivrer le système ADN dans les cellules de la plante. Cependant, l'ADN-T peut être remplacé par d'autres séquences d'ADN, sans avoir d'effet négatif sur le transfert de l'ADN. C'est ce qui a permis la mise en place d'un système de transformation d'abord pour les plantes, puis par la suite pour les champignons. Il s'agit d'utiliser un système binaire, c'est-à-dire qu'il y a l'ADN que l'on veut transférer sur un plasmide, et sur un autre plasmide la région de virulence qui contient les gènes de tranfert de l'ADN-T, mais plus les gènes qui forment la tumeur (Hoekema *et al.,* 1983 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

1.6.2.2. Les mécanismes de transformation

Chez la bactérie sauvage

Pour activer les gènes *vir* qui encodent le système de transfert de l'ADN-T de *A. tumefaciens*, la présence de composées phénoliques est indispensable, comme l'acétosyringone. Il y a alors un système de deux composants régulateurs de protéines, appelé VirA et VirG qui sont activés. Une protéine chromosomique appelée ChvE est encodée et interagit avec VirA, pour améliorer l'induction de *vir* en présence de monosaccharides spécifiques (Cangelosi *et al.,* 1990). VirA, une protéine intra-membranaire, va alors reconnaitre la présence de l'acétosyringone et s'autophosphoryler. La protéine phosphorylée transfère son groupe phosphoryle à la protéine VirG. Cette protéine devient à son tour active et possède des propriétés de liaison de l'ADN. La protéine active agit comme un activateur transcriptionnel de son gène, mais aussi d'autres gènes localisés dans la région de virulence (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

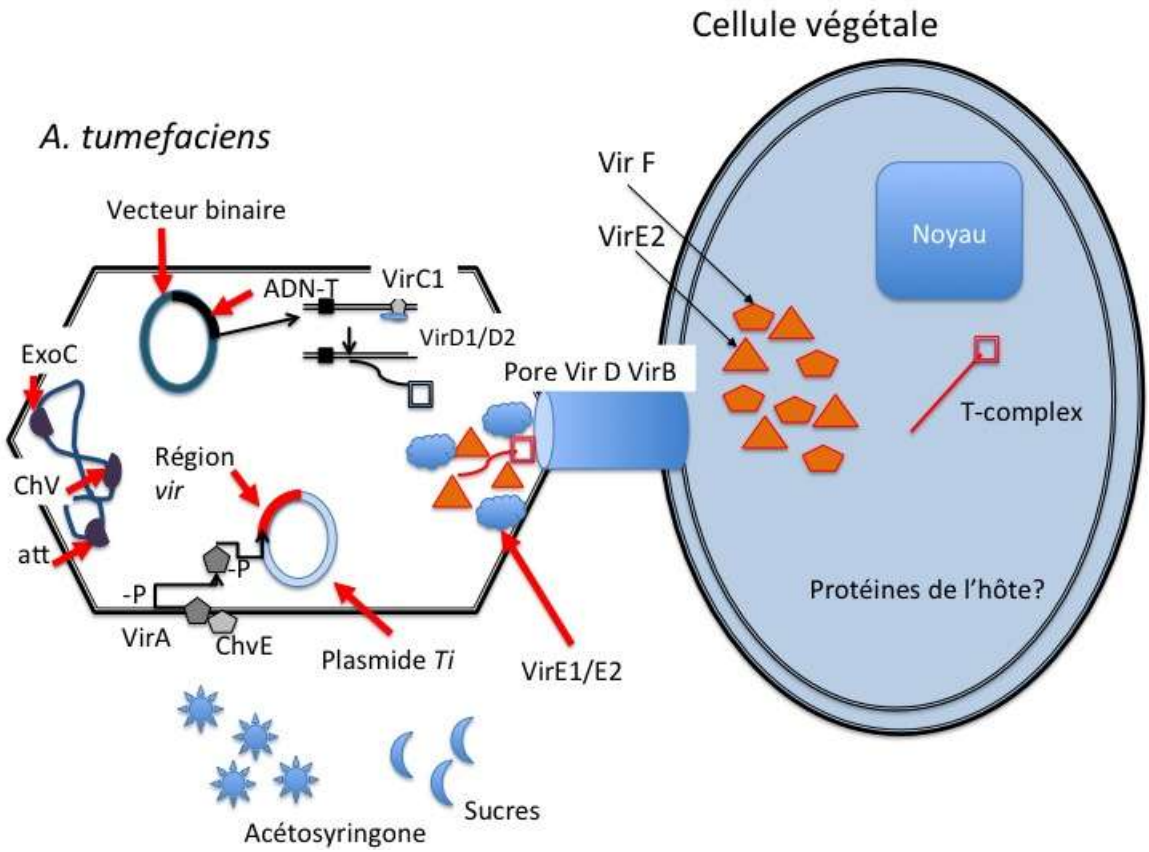


Figure 1.7 : Mécanisme de transfert de l'ADN chez *Agrobacterium tumefaciens* (d'après le schéma de Michielse *et al.*, 2005)

Pour le transfert de l'ADN-T (Figure 1.7), celui-ci doit être à l'état simple brin. Cela nécessite l'intervention de deux autres gènes : *vir*C et *vir*D. Deux protéines vont être impliquées : VirD1 et VirD2, qui vont entailler précisément le brin inférieur de la région répétée. La formation du brin d'ADN-T est stimulée par une séquence *overdrive*, dans la séquence proche de la région répétée de droite (van Haaren *et al.,* 1987 ; Veluthambi *et al.,* 1988 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). La protéine VirC1 peut se lier à cette séquence *overdrive,* et stimuler la formation de brin ADN-T (Toro *et al.*, 1988 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). La protéine VirD2 reste liée de manière covalente à la fin du brin ADN-T (au niveau du 5') (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

Quand la copie d'ADN-T est synthétisée, l'étape suivante est le transfert de l'ADN-T à travers la membrane bactérienne et la paroi végétale, pour atteindre le noyau végétal, par un système de sécrétion de type IV. Deux autres familles de protéines vont alors agir : VirB et VirD4. Les protéines VirB sont responsables de la formation d'un pore de transport et d'une structure sur la surface appelée le pilus T. Ce pilus T est composé de pilin-T, une molécule formée par VirB2 (Christie, 1997 ; Kado, 2000 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). La protéine VirD4, de la membrane interne, dirige l'interaction entre le brin d'ADN-T et le complexe VirB. C'est ce qui est appelé système de sécrétion de type IV (Regensburg-Tuink et Hooykaas, 1993 ; Vergunst *et al.,* 2000 ; Schrammeijer *et al.,* 2003 ; Vergunst *et al.,* 2003 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). D'autres protéines de virulences, VirE2, VirE3 et VirF sont également exportées par le système de sécrétion de type IV. Le rôle de VirE2 semble être de protéger l'ADN-T contre les nucléases et de le maintenir dans un état déplié pour faciliter son transfert dans le pore nucléaire (Citovsky *et al.,* 1989 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). L'ADN-T est ciblé au noyau par un signal de localisation nucléaire, qui est présent sur la protéine VirD2. Une fois dans le noyau, l'ADN-T s'insère dans le génome. Le mécanisme par lequel l'ADN-T est intégré n'est pas encore connu, mais il semble que les protéines de l'hôte jouent un rôle important dans ce processus (Bundock *et al.,* 1995 ; Gelvin, 2000 ; Tzfira et Citovsky, 2002 ; van Attikum *et al.,* 2001 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). C'est donc par ce système que la bactérie transfère son ADN dans celui de l'hôte. L'ADN de la bactérie va être ensuite exprimé dans la cellule hôte, et va provoquer la prolifération cellulaire à l'origine de la galle (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

La transformation

En transformation des plantes et des champignons, la bactérie utilisée garde le système de virulence qui permet le transfert de l'ADN. Mais la bactérie n'est plus pathogène, donc ne provoque plus de galle, les gènes induisant la tumeur étant désactivés. Seul l'ADN d'intérêt va être transféré à l'hôte, suite à la transformation de la bactérie elle-même, par l'insertion du plasmide d'intérêt, qui contient généralement deux marqueurs de sélection : l'un pour sélectionner la bactérie transformée, et le second pour sélectionner la

plante ou le champignon qui a acquis le plasmide d'intérêt. Il faut noter également que les bactéries utilisées dans les transformations de plantes et de champignons possèdent deux plasmides. Le premier plasmide a les gènes de virulence, pour permettre le transfert de l'ADN-T. Le second plasmide a de l'ADN-T, et le gène d'intérêt à transférer. La taille de ce second plasmide peut varier selon le type de manipulation réalisée. Il semble également que la bactérie soit capable d'utiliser des mécanismes cellulaires de son hôte qui soient communs à de nombreux organismes. A l'heure actuelle, il semble qu'il y ait environ 60 champignons qui ont été transformés par cette méthode. Ces champignons appartiennent à l'ordre des Ascomycètes, Zygomycètes et Basidiomycètes (McClelland et Wickes, 2009). Cette méthode a également l'avantage de s'appliquer à des champignons qui ne sont pas facilement transformables avec d'autres techniques conventionnelles, qu'ils soient d'une importance médicinale, agricole ou économique importante, comme *Magnaporthe grisea* (Khang *et al.*, 2005), *Coccidioides immitis* (Abuodeh *et al.,* 2000) et *Agaricus bisporus* (de Groot *et al.*, 1998). Le principe général est présenté Figure 1.8.

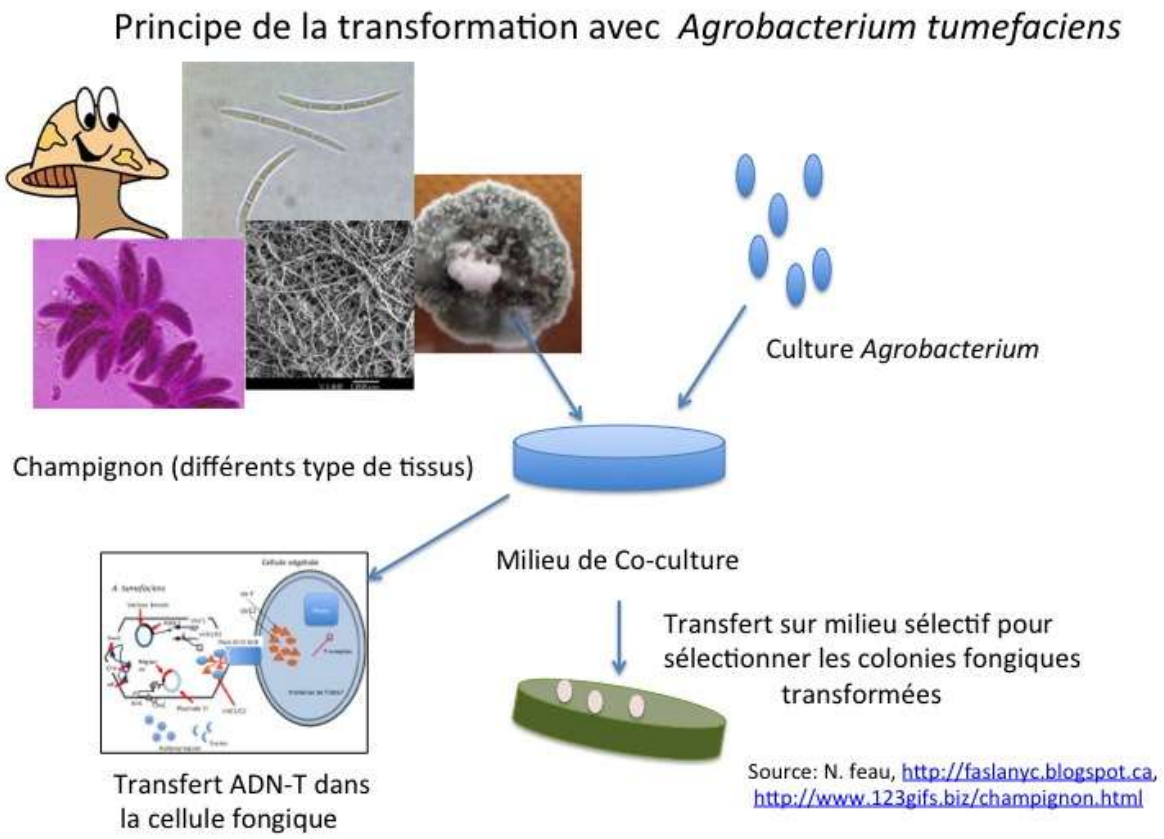


Figure 1.8 : Principe de la transformation fongique avec *Agrobacterium tumefaciens*

Des études (Bundock *et al.*, 1995 ; de Groot *et al.,* 1998) ont déduit que la transformation de champignon par *Agrobacterium tumefaciens* est dirigée par le système de virulence. Des expériences avec des mutants d'*Agrobacterium* ont été menées. Ces bactéries étaient inactivées dans l'un des composants clés requis pour l'induction du système de transfert de l'ADN-T, et le transport de l'ADN-T. Le nombre de transformants formés à la fois chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus awamori* était complètement aboli ou sévèrement réduit. Ceci montre que le mécanisme de transfert de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* joue un rôle important dans la génération de transformants fongiques. Cependant, il y a quelques différences entre les transformations fongiques de plantes et de champignons, notamment au niveau des protéines de virulence, comme VirE2, qui affectent la virulence d'*A. tumefaciens* sur les plantes, alors que le nombre de transformants est

réduit chez *S. cerevisiae* et *A. awamori* de 10%, et 63% respectivement. D'autres protéines de virulence indispensables pour la transformation de plantes ne le sont pas pour la transformation de champignon comme *A. awamori.* C'est le cas des protéines VirF, VirH et VirE3 qui sont dispensables pour la transformation de *A. Awamori* (Michielse *et al.,* 2004 ; Michielse *et al.,* 2005). En outre, lorsque la souche d'*Agrobacterium* était mutée sur le gène chromosomique *chvA*, *chvB* ou *exoC*, l'efficacité de transformation de *S. cerevisiae* était la même que pour la transformation avec la souche non mutée (Piers *et al.*, 1996). Ces gènes chromosomiques sont impliqués dans la synthèse et l'exportation du β-1,2-glucan, et sont nécessaires pour l'attachement et pour la transformation de la cellule végétale. Cependant, la molécule β-1,2-glucan ne semble pas indispensable à la transformation de *S. cerevisiae* (Matthysse, 1983 ; Matthysse, 1987 ; Michielse *et al.,* 2005), alors que le β-1,2-glucan améliore la fréquence de transformation chez *A. awamori*, par rapport à la souche d'*Agrobacterium* sauvage (van Dijk et Michielse, *unpublished data* ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

Il semble également que des protéines de l'hôte jouent un rôle dans la transformation avec *Agrobacterium*. Ces protéines ont été récemment identifiées. Par exemple, certaines d'entre elles interagissent avec les protéines de virulence de translocation dans la cellule de la plante, dont l'une d'elles a été identifiée comme étant : *VirD2-interacting protein karyopherin α.* Il s'agit d'une protéine conservée du système de transport protéique nucléaire chez les Eucaryotes. Une autre manière d'améliorer la transformation est l'addition d'inhibiteur de purine de synthèse, qui permet une augmentation transitoire de l'expression de l'ADN-T (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

Différents facteurs semblent également jouer un rôle sur le taux de transformants chez les champignons : le matériel fongique de départ (conidies, spores, spores germées, mycélium, tissues fongiques de fructifications), la souche *d'A. tumefaciens* utilisée, l'isolat fongique, et les conditions de co-culture (pH du milieu, taux d'acétosyringone, température, temps de co-culture, ratio bactérie/champignon…). Il semble que chaque champignon possède des paramètres qui lui sont propres pour permettre une transformation optimale (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009).

1.6.3. Inactivation des gènes

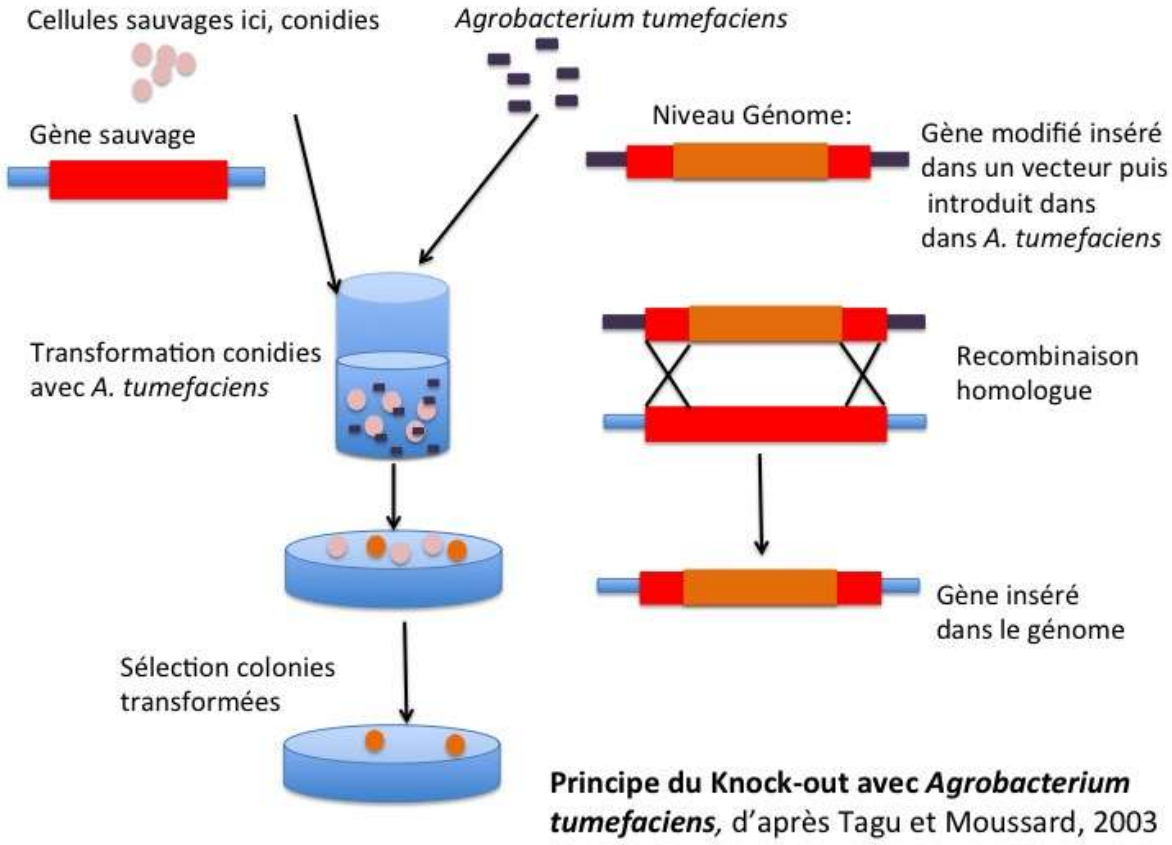


Figure 1.9 : Principe de l'inactivation d'un gène (d'après Tagu et Moussard, 2003)

L'inactivation des gènes (Figure 1.9) (*Knock-out* ou *KO*) est une technique qui permet d'obtenir des organismes génétiquement modifiés. Ces organismes génétiquement modifiés possèdent un gène d'intérêt qui est interrompu dans sa séquence codante et dont la protéine ne peut plus être synthétisée dans ces organismes mutants. Ce gène d'intérêt est généralement un gène dont on cherche à connaître ou à confirmer la fonction. En effet, il existe de nombreuses banques de données internationales, comme *NCBI* (*National Center for Biology Information*) qui archivent des séquences de génomes d'organismes divers. En

comparant les séquences d'un gène obtenu sur un organisme que l'on étudie, on peut découvrir une fonction similaire à celle d'un autre organisme. Il se peut également qu'on ne puisse pas déterminer sa fonction, car elle est unique à cet organisme. Dans les deux cas, on a besoin de la méthode d'inactivation de gènes. Dans le premier cas, cette technique permet de valider expérimentalement la fonction similaire du gène. Dans le second cas, elle permet d'obtenir un organisme transgénique, ne possédant plus le gène valide. Ainsi, on peut déterminer le rôle de la protéine (Tagu et Moussard, 2003).

Pour étudier un gène, il faut donc transformer génétiquement un organisme, avec l'intégration d'un transgène dans la séquence du gène étudié, et non au hasard dans le génome. Ceci afin de permettre la détermination de son rôle dans l'organisme. Pour cela, la technique historiquement utilisée est de transformer *in vitro* à l'aide d'enzymes de restriction le gène d'intérêt, en y plaçant la séquence codant pour un gène de sélection, comme la résistance à un antibiotique. Ainsi, le gène interrompu donnera une protéine incomplète et inactive, et l'organisme porteur du gène de sélection sera résistant, par exemple à l'antibiotique auquel il est sensible normalement. A l'heure actuelle, il existe d'autres méthodes pour construire le gène inactivé de façon simplifiée, comme le kit *MultiSite Gateway® Technology* d'Invitrogen (Tagu et Moussard, 2003).

Comme le gène créé est coupé dans sa séquence codante, il va donc produire une protéine incomplète et inactive. Ce gène tronqué doit être intégré dans le génome de l'organisme à l'étude. On peut par exemple utiliser *Agrobacterium tumefaciens* pour intégrer l'ADN, ou la méthode de l'électroporation. La sélection des organismes transformés se fait sur un milieu contenant l'agent sélectif. Par exemple, dans le cas de la résistance à un antibiotique, on met le dit antibiotique dans le milieu à une concentration létale pour l'organisme non transformé (Tagu et Moussard, 2003).

Lors de la transformation, il y a trois évènements qui peuvent se produire. Dans le premier cas, il y a intégration du gène muté, qui remplace le gène sauvage. Dans le second cas, l'intégration se fait au hasard dans le génome. Il faut donc trier les transformants qui ont subi la recombinaison homologue. Le troisième cas, assez fréquent, est l'absence de l'intégration du gène muté dans le génome de l'organisme. Pour la plupart des

champignons, l'identification se fait à *posteriori*. Pour cela, on analyse le site d'intégration dans le génome des cellules résistantes à l'agent sélectif. Les enzymes de restriction sont utilisées pour digérer l'ADN génomique, et distinguer le gène endogène non touché par l'insertion du gène endogène modifié par transgène. Cela permet ensuite d'étudier le phénotype des organismes devenus incapables de synthétiser la protéine fonctionnelle (Tagu et Moussard, 2003).

Lors de l'inactivation des gènes, il y a deux événements de recombinaison qui doivent avoir lieu pour l'insertion du gène modifié dans l'organisme. En effet, il est nécessaire d'avoir une recombinaison homologue aux deux extrémités du gène pour permettre l'insertion du gène modifié au bon endroit. Cet événement est rare, et la fréquence de recombinaison homologue est faible. Dans le cas d'organismes diploïdes, la mutation entraînée est une mutation récessive, puisque le gène fonctionnel est encore présent dans la seconde copie du gène, et peut donc s'exprimer. La recombinaison homologue ne touche qu'une des deux copies du gène. Par conséquent, pour étudier le phénotype muté, il faut travailler avec des organismes haploïdes lorsque cela est possible comme chez certains champignons, ou réaliser des lignées pures par autofécondation pour les plantes et des croisements entre descendants de transformants pour obtenir des homozygotes de ce gène (Tagu et Moussard, 2003). Une troisième solution possible est d'utiliser deux cassettes de délétion pour désactiver les deux allèles d'un gène, comme chez *Candida albicans* où la transformation se fait en deux temps. La première cassette contient un marqueur auxotrophe, comme l'histidine, la seconde l'allèle désactivé. Dans un premier temps, la recombinaison homologue se fait avec le marqueur auxotrophe. La souche qui est utilisée pour cette première transformation n'est pas capable de synthétiser l'histidine, par exemple, sans le marqueur auxotrophe que l'on insère. Ainsi, pour sélectionner les souches mutantes, il faut utiliser un milieu minimum qui ne contient pas d'histidine (ou un autre marqueur auxotrophe). Une fois que cette première étape est faite, la deuxième transformation est effectuée, cette fois-ci avec le gène désactivé que l'on étudie. Ainsi, il n'y a pas besoin d'avoir une double recombinaison homologue, qui est un évènement très rare et qui nécessite un nombre élevé de mutants pour espérer trouver un mutant ayant subi la double recombinaison (Noble et Johnson, 2005).

1.6.4. Les réussites et échecs de transformations avec *A. tumefaciens*

A l'heure actuelle, de nombreux champignons ont été transformés par la technique utilisant *A. tumefaciens.* De *Saccharomyces cerevisiae* (Bundock *et al.*, 1995 ; Piers *et al.,* 1996 ; Bundock *et al.,* 2002) à *Mycosphaerella graminicola* (Zwier et deWaard, 2001)*,* ou *Magnaporthe grisea* (Rho *et al.,* 2001 ; Khang *et al*., 2005)*,* en passant par *Aspergillus giganteus* (Meyer *et al.,* 2003)*, Agaricus bisporus* (Chen *et al.*, 2000 ; de Groot *et al.,* 1998 ; Mikosch *et al*., 2001) ou *Neurospora crassa* (de Groot *et al.*, 1998), des représentants des différents ordres ont été transformés. Différentes sources de matériel fongique ont également été utilisés pour ces transformations : conidies, mycéliums, conidies germées, levures ou protoplastes. Différentes souches d'*A. tumefaciens* ont été utilisées, cependant aucune comparaison des souches lors d'une même transformation n'a été faite pour déterminer la plus favorable. Chaque transformation possède également une fréquence de transformation qui varie selon les organismes avec en moyenne 10^6 conidies au départ: de 6 transformants pour *A. bisporus* à 240 pour *Trichoderma reesei* (de Groot *et al.*, 1998). Bien que le protocole de base reste le même, Michiesle *et al.* (2005) précisent que pour une transformation efficace, certains paramètres peuvent changer selon les espèces fongiques, comme le temps d'incubation entre la bactérie et le champignon, ou la concentration en acétosyringone. Ainsi, de nombreux champignons ont pu être transformés avec succès, permettant de mieux les étudier, et mieux comprendre les mécanismes qui régissent les interactions hôtes-pathogènes des champignons pathogènes (Michielse *et al.,* 2005 ; Islam *et al.,* 2012).

Cependant, certaines espèces se sont également révélées plus récalcitrantes. Ainsi, *Sclerotinia sclerotiorum* n'a pas pu être transformé par la méthode utilisant *A. tumefaciens*, malgré la modification des différents paramètres (Rolland *et al.,* 2003). Lorsqu'ils ont tenté de transformer *A. niger*, Michielse *et al.* (2005) ont obtenu un faible nombre de transformants, et n'ont pas réussi à reproduire la transformation, alors que de Groot *et al*. (1998) le mentionnent comme un champignon transformable. Michielse et collaborateurs (2005) ont également testé de nombreux paramètres comme les conditions de co-culture, la

souche d'*Agrobacterium*, le ratio conidies-bactéries, la souche fongique utilisée, et le marqueur de sélection. Ceci n'a pas permis d'obtenir un protocole de transformation reproductible et efficace pour cette espèce. Pour d'autres espèces d'*Aspergillus*, le nombre de transformants obtenu peut varier énormément, pour un même organisme. Ainsi, pour *Aspergillus oryzae*, le nombre de transformants varie entre 0 et 40 pour 10^6 spores. Ainsi, Michielse et collaborateurs expliquent que l'incapacité de transformation d'*A. niger* est liée à une croissance de fond importante du champignon durant la transformation. Ils citent également l'existence de techniques pour éviter cette trop forte croissance en pratiquant la technique de superposition, ou en récoltant directement le mélange conidies-bactéries, et en l'étalant directement sur une boîte de Pétri contenant le milieu sélectif. Ceci pourrait donc expliquer leur incapacité à reproduire la transformation. Les auteurs font remarquer également que la connaissance sur la transformation fongique par *A. tumefaciens* ne cesse de croître, mais que le processus de transfert et d'intégration de l'ADN-T dans les cellules fongiques n'est pas complètement connu, et que les paramètres de transformations sont également très variables selon les espèces fongiques. Et qu'ainsi, en établissant un nouveau protocole de transformation avec *A. tumefaciens* et en améliorant les connaissances des différents processus de la transformation fongiques, la transformation de champignons récalcitrants serait envisageable avec des paramètres adaptés à chaque espèce (Michielse *et al.*, 2005 ; Islam *et al*., 2012).

1.7. Conclusion

Le chancre septorien est la maladie la plus dommageable qui affecte actuellement la culture de peupliers hybrides au Centre-Nord et au Nord-Est de l'Amérique du Nord. L'utilisation de clones sur une même parcelle a favorisé cette expansion, et limite en parallèle l'expansion de la culture de peuplier dans le reste du continent. Actuellement confiné à ce continent, des cas de chancre septorien ont été rapportés en Asie, suite à l'introduction de plants contaminés, mais semblent avoir été maîtrisés (Feau *et al.*, 2010). Il a également été récemment rapporté au Brésil (Santos *et al.,* 2010). L'utilisation dans une même plantation de plants d'une diversité génétique importante semble être le seul moyen efficace à ce jour pour limiter la maladie. En effet, aucun traitement chimique ne s'est révélé efficace sur le long terme. Qui plus est, la lutte biologique n'a pas encore été assez

étudiée, notamment au niveau de l'application en peupleraie, pour être actuellement utilisée. Reste la méthode des organismes génétiquement modifiés qui a montré de bons résultats expérimentaux, en utilisant des arbres avec un gène de résistance introduit, ou produisant une substance anti-microbienne. Mais l'utilisation de tels arbres n'est pas encore autorisée au Canada, et leur impact sur la flore fongique non pathogène n'est pas encore évalué (Ministère des Ressources Naturelles, 2011 ; Stefani, *et al.*, 2010). La diversité génétique des peupliers hybrides utilisés reste le meilleur moyen à l'heure actuelle de lutter contre le chancre septorien. En effet, cela permet d'éviter toute sélection du champignon qui serait capable de contourner la résistance mise en place dans les peupleraies. Mais cela risque de provoquer une baisse de rendement. Il faut donc combiner une diversité génétique avec une productivité satisfaisante (Feau *et al.*, 2010).

Cependant, une méthode de lutte ne peut être efficace que dans le cas d'une connaissance du champignon au niveau de sa répartition, de sa diversité génétique, et de son habitat. Le peuplier a d'abord été considéré comme l'hôte unique de la maladie, mais un cas sur le saule a été révélé. Ceci peut donc aboutir à une source d'inoculum du champignon dans une plantation (Feau *et al.*, 2005a).

Il reste cependant des zones d'ombre sur la maladie. En effet, la mise en place d'un système de transformation couplé à l'information apportée par le séquençage entier du génome de *S. musiva* pourrait entraîner la mise en place d'une lutte efficace contre la maladie. Il sera alors possible de comparer les gènes entre les *Septoria* responsables de maladies sur peuplier, pour ainsi comprendre le ou les mécanismes qui rentrent en compte dans la relation avec le peuplier, et notamment si les gènes de *S. musiva* causant le chancre sont également présent chez *S. populicola,* ce qui pourrait représenter un risque sur le long terme. Le génome du peuplier étant déjà séquencé depuis quelques années, la relation hôte-pathogène pourra alors être éclaircie. Il y aurait également la possibilité de connaître les mécanismes mis en place par le champignon pour infecter et se disperser dans l'environnement. Il a été démontré que sa production de conidies ne lui permettait pas d'être dispersé au-delà de quelques mètres (Feau *et al.,* 2005a). L'existence d'un éventuel vecteur n'est pas à exclure.

S. populicola ne semble pas avoir été très étudié, en raison de son moindre impact sur les peupleraies, car présent à l'état endémique sans dommages importants. Mais avec les changements climatiques, et l'évolution constante des champignons, le risque est grand de voir apparaître des épidémies liées à ce champignon, comme cela a déjà été le cas en 1993. Il faut également noter que bon nombre d'hybrides utilisés actuellement en peupleraies au Québec sont résistants, lorsque l'un des deux parents est *Populus deltoides* (Gagné, 2005). *S. populicola* peut néanmoins provoquer un chancre sur le tronc de peuplier baumier. Il reste donc une menace possible (Zalasky, 1978 ; Newcombe et Ostry, 2001).

L'approche de la transformation avec *A. tumefaciens* a permis de transformer de nombreux champignons, notamment des *Mycosphaerella*. En plus d'être très facile à réaliser, cette méthode permet également d'obtenir des transformants chez de nombreuses espèces récalcitrantes. Elle représente une méthode de choix pour la transformation fongique, bien que les mécanismes permettant la transformation ne soient pas connus chez les champignons.

Mon projet de maîtrise s'insère directement dans cette approche, et a pour objectif de mettre en place une technique de transformation de *S. musiva* et *S. populicola* pour, dans un second temps, étudier des gènes d'intérêt, et étudier leur fonctionnement. Dans un premier temps, afin de vérifier si les deux champignons utilisés peuvent être mutés, une transformation est réalisée sur des cellules fongiques, et sera présentée dans le chapitre 2.

2. Transformation aléatoire de *Septoria musiva* et *Septoria populicola*

2.1. Introduction

Depuis 1969, la production de peupliers hybrides s'est développée au Québec, sous la direction de Gilles Vallée, qui a mis en place le premier programme d'amélioration génétique. Ces hybrides comportent de nombreux avantages liés à une croissance rapide que ce soit en plantations ou en plaines où ils servent de brise-vent. Il existe de nombreuses utilisations du bois: sciages, déroulages, matériaux composites, bois d'usinage, bois d'ingénierie, pâtes, cartons, et biomasse énergétique (Feau *et al.*, 2005a ; Gagné 2010 ; Bigué *et al.,* 2011).

De nombreux hybrides ont été créés à partir d'espèces sauvages, comme *Populus deltoides*, et *P. trichocarpa*, ce qui a permis d'obtenir des troncs de bonne circonférence (Soulères, 1992). Ces hybrides ont différentes origines, l'une spécifiquement interaméricaine, l'autre euraméricaine, dont l'un des parents est américain, et l'autre européen (Soulères, 1992). Il existe également des hybrides dont un des parents est asiatique (Feau *et al.*, 2010). Au fil des sélections, l'homme a privilégié des qualités pour produire plus, plus rapidement. Mais, bien souvent, cela se fait au détriment de la résistance à certaines maladies.

Ainsi, depuis plusieurs années, le chancre septorien est devenu une maladie épidémique en Amérique du Nord dans les plantations de peupliers, alors qu'elle est restée à l'état endémique dans les forêts (Strobl et Fraser, 1989 ; Gagné, 2005). Cette maladie pose de nombreux problèmes, puisqu'elle a limité l'expansion de la populiculture dans le Centre-Nord, et le Nord-Est de l'Amérique du Nord. En effet, à l'heure actuelle, de nombreux hybrides utilisés en populiculture semblent sensibles à la maladie (Gagné, 2005 ; Feau *et al.*, 2010). Le chancre septorien cause de nombreux dégâts, principalement sur le tronc en fragilisant celui-ci. L'agent pathogène responsable cause également des taches foliaires. Dans les cas extrêmes, où les taches foliaires peuvent conduire à une défoliation

prématurée de l'arbre, on a observé des diminutions de développement chez les cultivars les plus sensibles, avec une perte de biomasse allant jusqu'à 63% (Ostry et McNabb, 1983 ; Feau *et al*., 2010).

Le chancre septorien est dû au champignon *Septoria musiva* (téléomorphe *Mycosphaerella populorum*). Il est capable de provoquer l'échec d'une plantation à lui seul, comme cela a été le cas dans le Centre-Nord des États-Unis, ainsi que dans la province de l'Ontario, au Canada dans les années 80 (Ostry et McNabb, 1985). Le chancre septorien est actuellement localisé en Amérique du Nord, et au Brésil (Gagné, 2005 ; Feau *et al.,* 2010 ; Santos *et al.,* 2010).

On a pu constater la présence d'autres champignons du genre des *Septoria* : *Septoria populicola*, et *S. populi* suscitant également des taches foliaires, comme *S. musiva,* mais causant peu de dommages en milieu naturel (Newcombe et Ostry, 2001). *S. populi* est une espèce présente eu Europe. Une étude transcriptomique a été menée par Feau et collaborateurs (2006b), afin de mettre en place un moyen de détection et d'identification spécifique de *S. musiva.* La méthode utilisée a permis de créer une collection d'*EST* pour *S. musiva*, en utilisant les techniques de marqueurs *SSR* et de *PCR-RFLP*, permettant la création de marqueurs de régions codantes du génome du champignon (Feau *et al.*, 2006b).

Il reste cependant beaucoup de zones d'ombre sur les mécanismes qui interviennent dans l'interaction hôte-pathogène de ces deux champignons. En créant des mutants de gènes cibles, il est possible de comprendre ces mécanismes, et sur le long terme de trouver un moyen de lutte efficace contre ces maladies. Pour cela, différentes méthodes de transformations existent. L'une de ces méthodes est l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens.* De nombreuses transformations ont été réalisées sur des Ascomycètes, et de nombreux autres champignons filamenteux ou levuriformes depuis une quinzaine d'années (Payne *et al.*, 1998 ; de Groot *et al.,* 1998 ; Zwier et deWaard, 2001 ; Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). Il est donc envisageable de mettre en place une technique de transformation simple de ces deux champignons avec *A. tumefaciens*.

Dans cette partie, la mise en place de la transformation de *S. musiva* et *S. populicola*, par *A. tumefaciens* va être abordée pour répondre à l'objectif numéro un : vérifier que *S.*

musiva et *S. populicola* sont transformables de façon aléatoire. Le but étant de mettre en place un protocole efficace de transformation permettant de cibler des gènes.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Souches fongiques utilisées et milieux de culture

La souche de *Septoria musiva* utilisée est la souche so2202. Il s'agit d'une souche provenant de la région de Saint-Ours (province du Québec) et prélevée en 2002. Ce prélèvement s'est fait dans le cadre de l'étude de population de *Mycosphaerella populorum* en Amérique du Nord (Feau *et al.*, 2005a). Il s'agit d'une souche qui est très virulente sur peuplier (Louis Bernier, communication personnelle). La souche de *S. populicola* utilisée est la souche p02.02b. Cette souche provient de l'étude de Feau *et al.* (2006a), prélevée à Matane (Québec). D'autres souches de *S. populicola*, provenant de l'étude de Feau *et al.,* (2005b) ont également été utilisées pour obtenir une quantité supérieure de conidies : 0272A, 0274A, 02116A, 02120A, 02130A, 02139A, 02141A, 02150A, 02159A, 01266A, 02169A, 02180A.

Deux autres espèces fongiques ont également été testées : *S. populi,* et *Ophiostoma novo-ulmi*. La première est responsable de taches foliaires sur peupliers, en Europe. La seconde est l'un des agents pathogènes responsables de la maladie hollandaise de l'orme. La souche de *S. populi* utilisée est pn04.02. Cette souche a également été utilisée dans l'étude de Feau *et al.* (2006a), et provient du Sud de la France. Pour l'espèce *O. novo-ulmi*, la souche utilisée est H327, provenant de Bratislava (Tchécoslovaquie), prélevée en 1979. La culture a été faite sur du milieu minimum liquide, sous agitation à 110 *rpm* (Bernier et Hubbes, 1990), au stade levuriforme du champignon.

Les souches ont été cultivées sur des boîtes de Pétri en milieu *PDA*, contenant deux antibiotiques : cefotaxime (100 μg/mL) et moxalactame (100 μg/mL), afin d'éviter toute contamination bactérienne. La présence de cefotaxime dans le milieu solide permet également à la souche de *S. musiva* de produire une forte quantité de conidies (résultats non

publiés). Les souches sont renouvelées toutes les deux semaines, par des conidies conservées à -80°C, dans le glycérol 15%.

Dans le cas du milieu *PDA* sur boîte de Pétri, la récolte de conidies se fait en versant 2 mL d'eau stérile sur la boîte et par la suite, en prélevant les conidies sur le mycélium à l'aide d'un râteau stérile. On récupère ensuite les conidies avec une pipette. Les conidies sont rincées par centrifugation (1 min, 13000 *rpm*). Celles-ci sont ensuite suspendues dans 1 mL d'eau stérile. Ensuite, les conidies sont dénombrées sur cellules de Neubauer, sous microscope optique, à une dilution au 1/100. La cellule de Neubauer, comme de nombreux hématimètres, est composée d'un quadrillage au centre de la cellule. Celui-ci a un grand carré subdivisé en 25 plus petits. Le volume total de la cellule est de 1 mm^3. Il y a dans une cellule de Neubauer, deux de ces carrés, permettant de doubler la mesure, et d'en prendre la valeur moyenne.

Un autre milieu a été utilisé pour produire des conidies pour les trois espèces de *Septoria*: les grains de millet. Pour ce milieu, 20 g de grains de millet ont été utilisés, avec 20 mL d'eau, puis stérilisés par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C. Par la suite, les conidies sont récupérées par rinçage à l'eau distillée des grains de millets placés sur un filtre de type *Cell stainer*, de taille de pores de 100 µm (BD Falcon).

Des tests ont également été préalablement faits pour évaluer la résistance de *S. musiva* et *S. populicola* à l'hygromycine B à 25, 50 et 100 µg/mL. Ces souches sont sensibles à partir d'une concentration de 50 µg/mL (résultats non publiés).

2.2.2. Plasmides utilisés

Lors des transformations, deux plasmides ont été utilisés. Le premier est pPT1 (Annexe 3), le second pPL1 (Annexe 3). Le plasmide pPT1 possède le gène de résistance à l'ampicilline et le gène de résistance à l'hygromycine B, ainsi que de nombreux sites de reconnaissance d'enzymes de restriction, notamment *Bam*HI, *Eco*R1, *Hind*III, *Sma*I, *Xma*I. Ce plasmide a une taille de 11336 pb. Le gène de résistance à l'ampicilline permet de vérifier que l'on sélectionne des bactéries qui ont intégré le plasmide pPT1. Le gène de

résistance à l'hygromycine B est le marqueur de sélection de la transformation. C'est grâce à ce gène que l'on va pouvoir vérifier la transformation chez les deux champignons.

Le plasmide pPL1, quant à lui, possède le gène de résistance à la kanamycine, et le gène de résistance à l'hygromycine B. Il a également des sites d'enzymes de restriction, comme *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Sma*I, *Xma*I. Sa taille est de 8331 pb. Le gène de résistance à la kanamycine va permettre de sélectionner les bactéries qui possèdent le plasmide pPL1.

2.2.3. Souches bactériennes et milieux utilisés

Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées sont GV3101 ::pMP90 et C58 ::pMP90. Celles-ci sont sensibles à l'antibiotique kanamycine et résistantes à la gentamycine et à la rifampicine. La gentamycine maintient les gènes de virulence qui permettent la transformation chez *A. tumefaciens*, alors que la résistance à la rifampicine provient de la mutation du plasmide *Ti* contenant les gènes de virulence, et permet le maintien de ce plasmide dans la bactérie pour permettre la transformation. Ces deux antibiotiques permettent de sélectionner uniquement *A. tumefaciens* dans le milieu où elle se développe (Lee et Gelvin, 2008).

Les bactéries sont cultivées sur un milieu liquide de YEP (Marie-Josée Morency, communication personnelle ; Annexe 2 pour composition du milieu), contenant les antibiotiques gentamycine et rifampicine (30 µg/mL et 10 µg/mL respectivement). La culture bactérienne est laissée en incubation toute la nuit, à 28°C, et sous agitation (200 *rpm*). Le lendemain, la culture est transférée dans du milieu YEP frais, et laissée incuber dans les mêmes condtions que la veille mais pendant 6 heures (Pikaard, consulté le 20 janvier 2013).

2.2.3.1. La transformation d'Agrobacterium tumefaciens

Le plasmide pPL1 est extrait à partir de la souche *Escherichia coli DB3.1*^{TM} (*Invitrogen Life Technologies*), à l'aide du kit d'extraction *GenElute Plasmid* de Sigma. La présence du plasmide, ainsi que sa taille sont vérifiées sur gel d'agarose 0,8 % avec du TAE

(*Tris Acetate EDTA*) (1X), et le plasmide est dosé au spectrophotomètre ND-100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, MD), pour déterminer sa concentration. Le logiciel utilisé est le nd-1000 (version 3.2.1, Nanodrop Technologies).

Pour intégrer le plasmide pPL1, la méthode utilisée est le choc thermique pour GV3101 (Pikaard, consulté le 20 janvier 2013), et l'électroporation pour C58. Pour le choc thermique (Pikaard, consulté le 20 janvier 2013), il faut lancer en premier une culture sur boîte de Pétri de la bactérie GV3101, à 28°C, sur du 2×YT (*Yeast Tryptone*). Le milieu 2×YT contenant la rifampicine et la gentamycine est ensemencé à partir d'une colonie unique. La culture est laissée à 28°C, toute la nuit sous agitation (200 *rpm*). Par la suite, on inocule à partir de cette culture un milieu frais de 2×YT, avec un rapport de 1/100 de volume. La culture est laissée à 28°C pendant 6 heures sous agitation (200 *rpm*).

Ensuite, la culture est mise sur glace pendant 5 à 10 minutes, puis centrifugée à 3000 *rpm* pendant 5 minutes à 4°C, dans des tubes stériles. Le surnageant est jeté et le tube est maintenu tête en bas pendant 30 à 60 secondes, pour éliminer le surplus de surnageant. Le culot est suspendu dans 1 mL $CaCl_2$ (20 mM), également refroidi au préalable sur glace. Par la suite, on utilise 0,2 mL de culture que l'on met dans des tubes 1,5 mL stériles également refroidis sur glace (Pikaard, consulté le 20 janvier 2013).

Il faut ensuite ajouter à la culture 1 µg de plasmide à transformer, ici pPL1. Le mélange est homogénéisé par tapotement. Il y a également un tube témoin, où aucun plasmide n'est mis en contact avec la bactérie. Les tubes sont ensuite mis dans de l'azote liquide pendant 30 secondes, puis chauffés pendant 5 minutes, à 37°C, permettant de fragiliser la paroi de la bactérie et faciliter l'entrer du plasmide pPL1 par choc thermique (Pikaard, consulté le 20 janvier 2013).

Les bactéries sont ensuite stabilisées en ajoutant 1 mL de 2×YT, pour leur permettre de reconstituer la paroi, et transférées dans des tubes 15 mL stérile, et laissées incuber pendant 2 heures, sous agitation à 28°C. Les cultures sont ensuite centrifugées à 4000 *rpm*, puis re-suspendues dans 100 µL de 2×YT, et étalées sur du milieu 2×YT solide contenant la rifampicine (10 µg/mL), la gentamicine (30 µg/mL) et la kanamycine (50 µg/mL). Le dernier antibiotique permet la sélection des bactéries transformées. Elles sont laissées 2

jours à 28°C, dans le noir. Elles sont ensuite utilisées pour ensemencer du milieu YEP liquide (Marie-Josée Morency, communication personnelle), avec les antibiotiques appropriés, pour effectuer la transformation de *Septoria,* mais également conservées par la suite à -80°C, dans du glycérol 30% et du YEP frais (Pikaard, consulté le 20 janvier 2013).

Pour la souche C58, il suffit de mettre le plasmide en présence de la bactérie et de les électroporer à 160 V. Par la suite, il faut ajouter du SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite repression*), pour permettre à la bactérie de reconstituer sa paroi. Enfin, la culture bactérienne est laissée 2 heures à 28°C sans agitation. Au bout de ces deux heures, on étale sur boîte de Pétri sur du milieu YEP avec de la kanamycine à 50 µg/mL, et les bactéries sont laissées 2 jours à 28°C. Le milieu solide permet de les garder plus longtemps à 4°C. Par la suite, des cultures liquides sont effectuées dans du YEP pour permettre la conservation à -80°C, et permettre l'utilisation de ces cultures dans les différentes transformations (Marie-Josée Morency, communication personnelle).

2.2.4. Transformation de *S. musiva* et *S. populicola*

Pour réaliser la transformation des *Septoria*, le protocole suivi est le protocole élaboré par de Groot, *et al.* (1998), pour transformer des champignons filamenteux. La seule différence se situe au niveau du matériel fongique. Dans notre cas, nous utilisons des conidies. Les milieux utilisés sont les milieux *IM* (*Induction Medium)* et *MM (Minimal Medium*) (Annexe 2 pour la composition des milieux). Il faut tout d'abord lancer pendant deux jours une culture d'*A*. *tumefaciens* GV3101 ::pMP90 :: pPL1 ou C58 ::pMP90 ::pPL1 et également une souche sans le plasmide (témoin), dans du milieu *MM*, à 28°C. Au deuxième jour, la densité optique (DO) est prise à 600 nm. Celle-ci doit être de 0,150 (Bundock *et al.*, 1995). En effet, il semble que la densité bactérienne affecte l'efficacité de la transformation. Selon le type d'organisme, cela peut varier. Notamment pour *Arabidopsis thaliana,* des densités comprises entre 0,15 et 1,75 à une absorption de 600 nm ont montré une différence d'efficacité de transformation de la plante, pour un même temps de croissance (Clough et Bent, 1998). Dans le protocole commun de transformation avec *A. tumefaciens*, la DO utilisée est de 0,150 (de Groot, *et al*. 1998). Il faut pour cela faire des

dilutions de la culture initiale. Un nouvel ensemencement est effectué, cette fois-ci dans du milieu *IM*. La culture est laissée 6 heures sous agitation (200 *rpm*), et à 28°C.

Pour effectuer la transformation, on recommande une concentration de spores de l'ordre de 2×10^8 spores/mL. Cela vient du fait que la recombinaison est un évènement rare. Il est donc important d'avoir un nombre élevé de conidies, pour qu'il y ait au moins une colonie transformée qui se développe. Pour évaluer la concentration de conidies, on utilise une cellule de Neubauer. La récolte des conidies est pratiquée comme décrite plus haut, dans la partie 2.2.1.

Ensuite, on met en contact les spores et les bactéries. C'est-à-dire qu'elles sont mises ensemble dans un tube 1,5 mL, avec un rapport de volume de 1/1 (500 µL chacun), et mélangées au vortex. Puis, elles sont étalées sur membranes de cellophane stérile (Bio-Rad *Laboratories,* Mississauga, Ont), reposant sur du milieu *IM*. Les membranes de cellophane sont mises sur le milieu *IM* la veille, afin de sécher. Le mélange est laissé deux jours sur milieu *IM*, à température ambiante, dans le noir. Puis, les membranes sont transférées sur milieu *PDA*, contenant de la cefotaxime (100 µg/mL), du moxalactame (100 µg/mL) et de l'hygromycine B (50 µg/mL). Les deux premiers antibiotiques permettent d'éliminer les bactéries, notamment *A. tumefaciens* et d'éventuelles contaminations. L'hygromycine B est le marqueur de sélection. Seules les conidies qui ont intégrer le gène de résistance au fongicide peuvent se développer, ou les conidies qui par mutation spontanée sont devenues résistantes à l'hygromycine. Par la suite, quand il y a des colonies fongiques, elles sont transférées sur du *PDA* frais, toujours avec l'hygromycine B (50 µg/mL), sans membrane. Elles sont laissées incuber entre 7 et 14 jours, à température ambiante.

2.2.5. Extraction de l'ADN

Pour extraire l'ADN, les souches fongiques résistantes à l'hygromycine B ont été cultivées sur du *Salt Minimal Medium* utilisé pour cultiver *Ophiostoma novo-ulmi*, par Bernier et Hubbes (1990). La source d'azote utilisée n'est cependant pas la même. Il s'agit ici de lait en poudre, ce qui donne une couleur blanche au milieu (Annexe 2 pour le détail de la composition du milieu). Les souches sont mises sous agitation (150 *rpm*), et laissées à température ambiante. Il faut en moyenne une dizaine de jours pour obtenir une quantité

suffisante de mycélium. Par la suite, les cultures sont récupérées dans des tubes de 50 mL, et rincées plusieurs fois à l'eau distillée, après une centrifugation à 4000 *rpm*, pendant 5 minutes, pour précipiter le mycélium. Les lavages ont pour but d'éliminer un maximum de polysaccharides. Par la suite, le mycélium est mis à lyophiliser durant deux jours. Un autre milieu a également été testé : le V8, auquel est ajouté du 0,2 % de $CaCO_3$ (Feau *et al.*, 2005a). Les conditions de croissances sont les mêmes que celles citées ci-dessus.

A la fin de la période de lyophilisation, les échantillons de mycélium sont récupérés pour être ensuite broyés sous azote liquide. Le broyat est réparti dans des tubes de 1,5 mL. Une portion du broyat est utilisée pour l'extraction de l'ADN, alors que le surplus est conservé à -20ºC. Pour l'extraction d'ADN, il faut qu'il y ait une quantité de broyat à 200 µL du tube 1,5 mL. Une quantité supérieure ou inférieure diminuerait le rendement d'extraction d'ADN (Philippe Tanguay, communication personnelle). Le protocole suivi pour l'extraction est celui de Moller *et al.* (1992). Une fois l'ADN extrait, il s'en suit une électrophorèse.

L'électrophorèse a pour but de vérifier la qualité de l'ADN extraite, ainsi que d'en évaluer la quantité. Le gel réalisé est à une concentration de 0,8% d'agarose et de *TAE* (1X). La révélation se fait grâce à du *Gel Red Nucleic Acid* (Biotium, Hayward, CA), à une concentration au 1/100. La solution est directement mise dans le gel d'agarose et TAE (1X). La migration se fait à 100 V, pendant 1 heure 30. La révélation se fait sous Ultra-Violet, avec le transilluminateur *genGenius BioImaging System* (Toronto). Le logiciel d'acquisition d'image utilisé est le GeneSnap (SynGene, MD).

Pour déterminer la concentration en ADN de chaque échantillon, la mesure est faite à l'aide du spectrophotomètre ND-100 (Nanodrop Technologies). Le logiciel utilisé est le nd-1000 (version 3.2.1, Nanodrop Technologies). Une fois l'extraction faite, l'étape suivante est le Southern blot.

2.2.6. Southern blot

Pour vérifier la cartographie du plasmide pPL1 (Annexe 3), des digestions avec des enzymes de restriction sont réalisées. Des digestions simples et multiples ont été faites

avec : *Eco*R1, *Hind*III, *Sma*I, *Xma*I, *Bam*HI, *Eco*RV, et *Asc*I. *Eco*RI est l'enzyme qui permet de sortir la cassette d'hygromycine B. L'enzyme *Hind*III reconnaît un site de restriction à 8286 pb, celui de *Bam*HI est à 8266 pb, les enzymes *Sma*I et *Xma*I sont à 8261 pb. Les enzymes *Asc*I et *Eco*RV reconnaissent un site de restriction à 6729 pb et 5490 pb respectivement. Toutes ces enzymes sont de la marque *New England* BioLabs®*Inc.*, et sont utilisées avec les tampons recommandés par le fournisseur, sur son site (http ://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp#.ULZHWKVQTQo, consulté le 20 janvier 2013). Par la suite, *Eco*R1 n'est pas utilisée dans le Southern, car elle ne permet pas de déterminer le nombre d'insertions du plasmide dans l'ADN génomique, puisqu'elle sort la cassette de l'hygromycine B. En effet, il est nécessaire que le plasmide soit coupé en un seul endroit, afin de déterminer le nombre de copies insérées lors de l'hybridation avec la sonde ADN marquée radioactivement, mais également de déterminer le taux de recombinaison. Pour cela, l'enzyme sélectionnée doit couper dans une zone proche de la cassette de l'hygromycine B. L'ADN génomique des souches résistantes à l'hygromycine B est digéré avec *Hind*III, toute la nuit. La digestion se fait à 37 ºC. Cette enzyme est utilisée avec le tampon 2 fourni avec l'enzyme (*New England* BioLabs®*Inc*).

Le produit de la digestion est ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose 1 % avec du *Tris Borate EDTA* (TBE ; 0,5 X). La migration est faite à 60 V, durant 6 heures. Le gel est vérifié sous UV. Le gel subit ensuite des lavages successifs. Un premier lavage de 15 minutes est fait dans l'acide chloridrique (0,24 N). Ce lavage permet de dépuriner l'ADN. Le second lavage se fait pendant 25 minutes dans une solution d'hydroxyde de sodium (0,4 N) et chlorure de sodium (0,6 M). Ce lavage permet de dénaturer l'ADN, afin qu'il soit sous forme simple brin et permettre la fixation de la sonde lors de l'hybridation. Ce lavage permet également d'éliminer les ARN résiduels. Le dernier lavage dure 30 minutes, et se fait dans un mélange de Tris-*Hydrochloride* (0,5 M) et chlorure de sodium (1,5 M). Ce lavage permet de neutraliser la membrane (Southern, 1975 ; Briese, consulté le 24 janvier 2013). La migration dans une solution saline par capillarité vers la membrane de nylon se fait toute la nuit, et selon le montage présenté à la Figure 2.1.

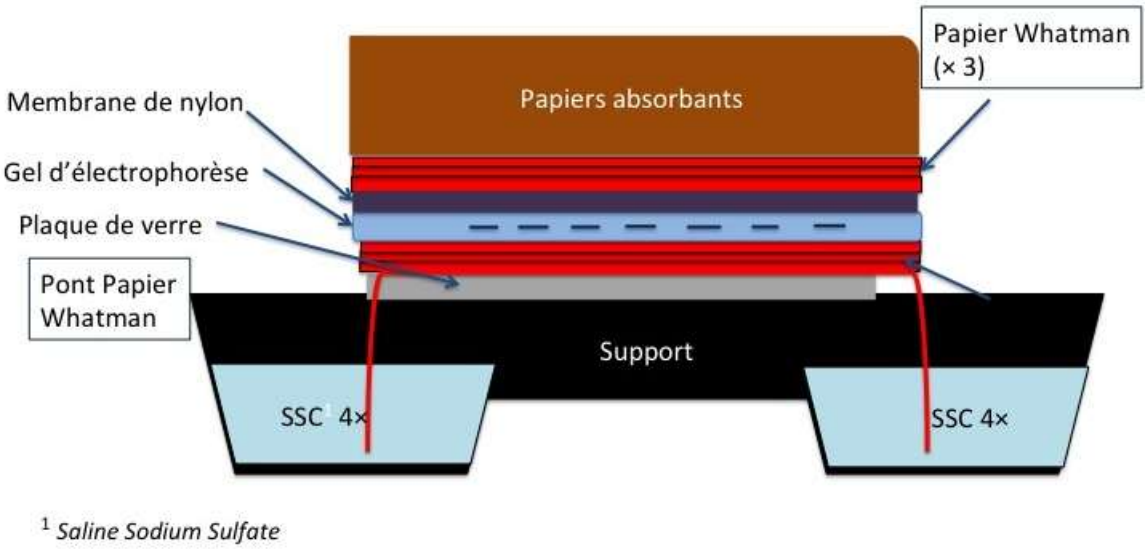


Figure 2.1 : Montage du transfert du gel d'électrophorèse à la membrane de nylon

Il y a trois papiers Whatman avant de poser le gel d'électophorèse, et également après la membrane de nylon. Le papier absorbant doit être présent en quantité suffisante pour permerttre le transfert de l'ADN entre le gel et la membrane.

Le lendemain, le gel est remis sous UV, ceci pour vérifier que le transfert est complet. La membrane est lavée 45 secondes dans de l'hydroxyde de sodium à 0,4 N. Un second lavage de 2 minutes est fait dans un mélange de Tris-*Hydrochloride* (0,2 M) et SSC (*Saline Sodium Citrate*) (2×). Ces lavages ont pour but d'éliminer les restants de gel ou de particules de la membrane (Southern, 1975 ; Briese, consulté le 24 janvier 2013). La membrane est laissée à sécher une dizaine de minutes entre un papier Whatman replié, à température pièce. La membrane est ensuite mise dans un nouveau papier Whatman sec replié, puis elle est exposée à des UV, pendant 3 minutes, afin de fixer l'ADN à la membrane de façon définitive. La membrane est gardée sous plastique à 4ºC, jusqu'au traitement radioactif.

2.2.7. Analyse d'hybridation par radioactivité

La sonde est la cassette d'hygromycine B et est obtenue par une *PCR,* dans les conditions classiques. Les amorces utilisées ont été créées à l'aide du logiciel *Vectot* NT1 de Invitrogen, et synthétisées par le CHUL. Les amorces sont :

- Hygro attB4r

GGGGACAACTTTTCTATACAAAGTTGTCGCCCTTCTAGCTAGCGTGGAGG

- Hygro attB3r

GGGGACAACTTTATTATACAAAGTTGTGAATTCGCCCTTGAAGATCTAACG

La *PCR* débute par une dénaturation de l'ADN à 98°C, pendant 1 minute. Puis, les 25 cycles sont composés d'une première étape qui dure 15 secondes à 98°C, une seconde étape à 58°C pendant 30 secondes, puis la dernière étape s'effectue à 72°C, pendant 1 minute. À la fin des 25 cycles, il s'en suit une période à 72°C, pendant 10 minutes. On vérifie sur gel la qualité de la bande d'ADN, en vérifiant que la bande présente est bien à environ 1520 pb pour pPL1 et pPT1. La sonde est ensuite dénaturée en chauffant l'ADN dans l'eau bouillante pendant 10 minutes. Elle est ensuite rendue radioactive avec le phosphore 32 (concentration 50 μCi ; Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts), en suivant les étapes du kit *High Prime DNA Labelling* (Roche). Pour réaliser l'hybridation de la sonde marquée avec l'ADN des souches résistantes, le protocole de base de Ausubel *et al*. (1997) est utilisé. La pré-hybridation de la membrane s'effectue toute la nuit, en présence de sperme de saumon (Life Technologies Ambio®, Burlington, ON), afin de permettre l'hybridation spécifique par la suite. L'hybridation se fait toute la nuit, en présence de la sonde radioactive.

Une fois que l'étape de l'hybridation est réalisée, la membrane est lavée, pour éliminer le surplus de sonde radioactive. Pour cela, deux lavages de cinq minutes chacun sont effectués avec une solution de 2× SSC/0,1% SDS, à température ambiante. Deux autres lavages de cinq minutes chaque sont effectués avec une solution de 0,2× SSC/0,1% SDS, et également à température ambiante (Ausubel *et al*., 1997). La membrane rendue radioactive est ensuite mise en contact d'un film (Kodak, High Resolution), dans une boite

hermétique, et exposée toute la nuit, à -80°C. Le film est développé dans une machine à développer (KODAK M35A-XOMAT).

2.3. Résultats

2.3.1. La transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Lors de la première transformation de *S. musiva* et *S. populicola* avec la souche GV3101::pMP90::pPT1, la transformation de la bactérie était préalablement faite par P. Tanguay, par la technique du choc thermique.

La technique du choc thermique n'a pas permis d'obtenir des colonies transformées *d'A. tumefaciens* avec le plasmide pPL1. Par la suite, la souche utilisée était C58::pMP90 dans laquelle le plasmide a été inséré par électroporation. La souche ne diffère pas de GV3101, puisqu'elle porte le même plasmide de virulence pMP90. Elles sont donc supposées être identiques. Cependant, elles peuvent différer à des loci du chromosome bactérien. Par la suite, nous avons constaté une différence dans la vitesse de croissance entre ces deux souches GV3101 et C58 (résultats non publiés). Afin de revenir aux conditions de la première transformation de *S. musiva* et *S. populicola*, la souche GV3101::pMP90 a été réutilisée (transformée par P. Tanguay) et contient le plasmide pPL1.

2.3.2. Transformation de *S. musiva* et *S. populicola*

Le tableau 2.1 présente un récapitulatif des 26 expériences qui ont été menées avec *S. musiva*, *S. populicola*, *S. populi* et la bactérie *A. tumefaciens*. Ce tableau récapitule les différents paramètres testés, ainsi que les espèces fongiques, et les souches utilisées pour *A. tumefaciens*.

Tableau 2.1 : Récapitulatif des 26 expériences de transformations

Expérience N°	Plasmide utilisé	Souche bactérienne utilisée	Espèces fongiques	Paramètres testés
1	pPT1	GV3101 ::pMP90	*Septoria musiva* *S. populicola*	*A. tumefaciens :* 2 jours dans *MM* liquide, à 28°C, et sous agitation à 200 *rpm.* Dilution pour que la DO soit à 0,150. Puis, les bactéries sont laissées 6 heures dans le milieu *IM* liquide, à 28°C et sous agitation à 200 *rpm.* Mise en contact des conidies (récoltées sur *PDA*) et des bactéries dans de l'eau stérile. Étalement sur membrane placée sur du milieu *IM* solide, et laissée 2 jours dans le noir, à température ambiante. La membrane est transférée sur du milieu *PDA* (H50+ Cefo+Moxa[12]), et laissée 7 jours dans le noir, à température pièce.
2 à 5	pPL1	C58 ::pMP90	*S. musiva* *S. populicola*	Paramètres de base
6	pPL1	C58 ::pMP90	*S. musiva*	Paramètres de base. Les conidies des deux champignons ont été récoltées sur

[12] H50 : hygromycine B à une concentration de 50 µg/mL ; Cefo et Moxa: Cefotaxime et Moxalactame à une concentration de 100 µg/mL

Expérience N°	Plasmide utilisé	Souche bactérienne utilisée	Espèces fongiques	Paramètres testés
			S. populi	des grains de millet Test de germination sur milieu *PDA*. Vérification de la façon de manipuler par Philippe Tanguay
7 et 8	pPL1	C58 ::pMP90	*S. musiva* *S. populi*	Paramètres de base, Test de germination sur milieu *PDA*. Conidies récoltées sur les grains de millet
9 et 10	pPL1 et pPT1	C58 ::pMP90 GV3101 ::pMP90	*S. musiva* *S. populi*	Paramètres de base (les conidies sont à nouveau récoltées sur du milieu *PDA*), Test de germination sur du milieu *PDA*
11	pPL1 et pPT1	C58 ::pMP90 GV3101 ::pMP90	*S. musiva* *S. populi*	Paramètres de base
12	pPL1	C58 ::pMP90 GV3101 ::pMP90	*S. musiva* *Ophiostoma novo-ulmi*	Paramètres de base

Expérience N°	Plasmide utilisé	Souche bactérienne utilisée	Espèces fongiques	Paramètres testés
13	pPL1	C58 ::pMP90 GV3101 ::pMP90	*S. musiva*	Paramètres de base. Vérification des calculs de concentrations d'antibiotiques et d'hygromycine B par Philippe Tanguay
14 à 17	pPL1	C58 ::pMP90 GV3101 ::pMP90	*S. musiva*	Paramètres de base
18 à 20	pPL1	GV3101 ::pMP90	*S. musiva*	Paramètres de base. Test de germination sur milieu *PDA*. La Rifampicine et la Gentamycine ont été ajoutées sur *IM*
21 et 22	pPL1	GV3101 ::pMP90	*S. musiva*	Paramètres de base, Test de germination sur milieu *PDA* et *IM* Température d'incubation du mélange *A. tumefaicens*-*S. musiva* (*IM*): 28°C (incubateur)
23	pPL1	GV3101 ::pMP90	*S. musiva*	Paramètres de base, Test germination *IM/PDA* (2 jours / 7 jours) Température d'incubation du mélange *A. tumefaicens*-*S. musiva* (*IM*): 28°C (incubateur) pour 10 boîtes, et température ambiante pour 10 boîtes
24 à 26	pPL1	GV3101 ::pMP90	*S. musiva*	Paramètres de base, Test de germination *IM/PDA* (2 jours / 7 jours). Évaluation du nombre de bactérie mis en contact avec le champignon.

Expérience N°	Plasmide utilisé	Souche bactérienne utilisée	Espèces fongiques	Paramètres testés
				Température d'incubation du mélange *A. tumefaciens/S. musiva* (*IM*): **26°C**

Le tableau présente une récapitulation des 26 expériences. Sur les 26 expériences, 25 expériences ont été effectuées avec pPL1 qui est le plasmide contenant le gène de résistance à l'hygromycine B et le gène de résistance à la kanamycine. Le plasmide pPT1 a été utilisé dans quatre expériences, et contient le gène de résistance à l'hygromicyne B et le gène de résistance à l'ampiciline. Le changement de plasmide est survenu suite à un problème dans la digestion du plasmide pPT1, puisque la cartographie obtenue ne correspondait pas à celle attendue. Plusieurs espèces fongiques ont également été testées : *S. musiva*, *S. populicola*, *S. populi* et *O. nono-ulmi*. La dernière espèce a été testée pour vérifier que la transformation s'effectuait avec la souche C58 ::pMP90 ::pPL1. Les espèces *S. populi* et *S. populicola* ont été testées pour la transformation, mais le nombre de conidies était inférieur à celui requit. Les transformations effectuées sur *S. musiva* de l'expérience 18 à 26 ont permis de vérifier les différents paramètres cités comme déterminants par Michielse *et al.* (2005) et McClelland et Wickes (2009).

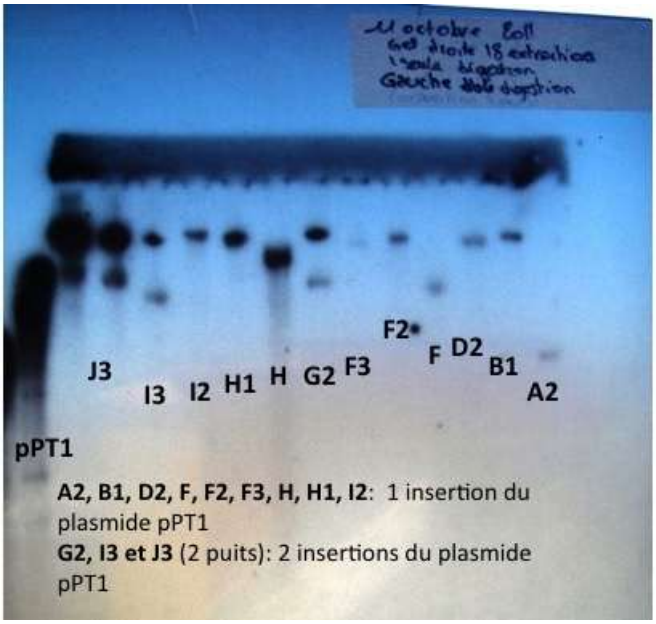


Figure 2.2 : Radiographie du *Southern blot* pour 12 souches testées de *Septoria musiva* transformée par *Agrobacterium tumefaciens*

A2, B1, D2, F, F2, F3, H, H1, I2, G2, I3, J3 sont 12 des 44 souches résistantes à l'hygromycine B obtenues pour *S. musiva* lors de la première expérience de transformation avec *A. tumefaciens* GV3101 ::pMP90 ::pPT1. Pour les souches A2, B1, D2, F, F2, F3, H, H1, et I2 une seule insertion du plasmide pPT1 a été faite. Pour les souches G2, I3 et J3, deux insertions du plasmide ont été observées. « pPT1 » représente le plasmide pPT1, qui correspond au témoin, et permet de vérifier la présence de l'hygromycine B dans le plasmide.

La première transformation a été effectuée avec le plasmide pPT1. La souche bactérienne GV3101:: pMP90 était déjà transformée par P. Tanguay. La transformation de *S. musiva* a permis d'obtenir 44 souches fongiques capables de se développer sur du milieu *PDA* contenant de l'hygromycine B (50 µg/mL). Le milieu minimum était plus approprié que le milieu V8 pour l'extraction de l'ADN. En effet, les souches qui se sont développées dans le milieu liquide V8 se sont révélées d'un aspect gluant. Sur les 44 souches obtenues, 12 ont été testées par Southern blot (Figure 2.2). Sur ces 12 testées, 75% ont montré l'insertion d'une seule copie et 25% l'insertion de deux copies. Lors de cette expérience, le nombre de conidies pour *S. musiva* était de l'ordre de 10^8 conidies/mL. Par la suite, la stabilité mitotique n'a pas pu être vérifiée, car les souches n'ont pas été repiquées par oubli, suite aux changements survenus dans le protocole (notamment avec le plasmide). Lors de

cette expérience, le nombre de conidies pour *S. populicola* était de l'ordre de 10^6 conidies /mL.

La transformation de *S. populicola* n'a pas permis d'obtenir de transformants, le nombre de conidies (en moyenne, 6×10^7 conidies/mL) (tableau 2.5) était inférieur à celui conseillé par le protocole de 2×10^8 conidies/mL. De nouvelles souches ont été testées: 0272A, 0274A, 02116A, 02120A, 02130A, 02139A, 02141A, 02150A, 02159A, 01266A, 02169A, 02180A (provenant de l'étude de Feau *et al.,* 2005a), qui n'ont pas produit plus de conidies que la souche utilisée initialement (p02.02b). Par la suite, le nombre de boîtes de Pétri a été augmenté (8 boîtes, au lieu des 4 pour *S. musiva*) pour obtenir un nombre suffisant de conidies, mais sans obtenir de transformants. Un autre milieu a également été testé pour la production de conidies: les grains de millet. Cependant, la quantité de conidies obtenue était de l'ordre 10^7 conidies/mL. Ce milieu a également été testé pour *S. populi* et *S. musiva*. Cependant, la quantité de conidies produite par les deux champignons était inférieure à la quantité produite sur le milieu *PDA*, contenant la cefotaxime et le moxalactame (résultats présentés en Annexe 5). Pour *S. populi* le nombre de conidies obtenues sur milieu *PDA* était de l'ordre de $2{,}4\times10^7$ conidies/mL (tableau 2.6). Cette quantité était inférieure aux 2×10^8 conidies/mL recommandées par le protocole. Les transformations ont également été tentées avec *S. populi*, sans qu'aucun transformant n'est pu être obtenu.

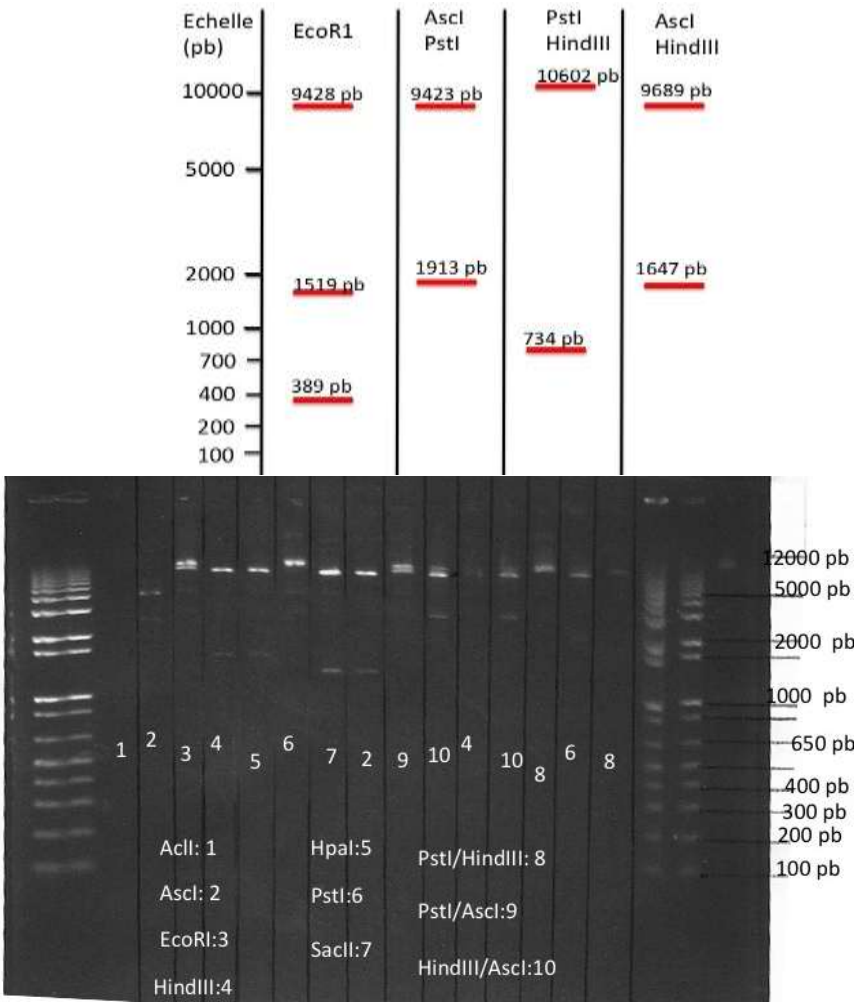


Figure 2.3 : Schéma des résultats attendus (en haut) et photographie des résultats obtenus lors de l'éctrophorèse (en bas) de la digestion du plasmide pPT1

L'image du haut représente les résultats attendus pour la digestion de pPT1 par les enzymes *Eco*RI, *Asc*I/*Pst*I, *Pst*I /*Hind*III et *Asc*I/*Hind*III. L'enzyme *Eco*RI possède trois sites de restriction sur le plasmide pPT1, il y a donc trois bandes attendues. Les doubles digestions *Asc*I/*Pst*I; *Pst*I/*Hind*III et *Asc*I/*Hind*III doivent normalement former deux bandes sur le gel. Sur la photographie du gel d'électrophorèse : du puits 1 à 7 une seule enzyme a été mise en contact avec le plasmide pPT1. Du puits 8 à 10, des doubles digestions (8 : *Pst*I/*Hind*III, 9 : *Pst*I/*Asc*I, 10 : *Hind*III/*Asc*I) ont été effectuées pour vérifier la cartographie du plasmide, et deux bandes apparaissent sur la photographie du gel d'électrophorèse. Le puits 3 correspond à l'enzyme *Eco*RI, qui sur ce plasmide a normalement trois sites de restriction, cependant, seuls deux sites sont révélés sur le gel d'électrophorèse. Pour les enzymes 1 (*Acl*I), 2 (*Asc*I), 4(*Hind*III), 5 (*Hpa*I), 6 (*Pst*I) et 7 (*Sac*II) un seul site de restriction est normalement présent sur le plasmide pPT1.

La vérification du plasmide pPT1 par digestion n'a pas permis d'obtenir la carte de restriction attendue sur le gel (Figure 2.3). En effet, la digestion du plasmide pPT1 par *Eco*RI a donné deux bandes sur gel, alors que l'on s'attendait à obtenir trois bandes. Les doubles digestions *Asc*I/*Pst*I, *Asc*I/*Hind III* et *Hind*III/*Pst*I n'ont pas donné les tailles de bandes escomptées, ni les deux bandes attendues pour les doubles digestions menées avec *Pst*I. Par conséquent, le plasmide a été remplacé par un autre: pPL1. Les produits de digestions sont présentés à la Figure 2.4, et correspondent à ceux attendus (schéma présentée à la figure 2.4).

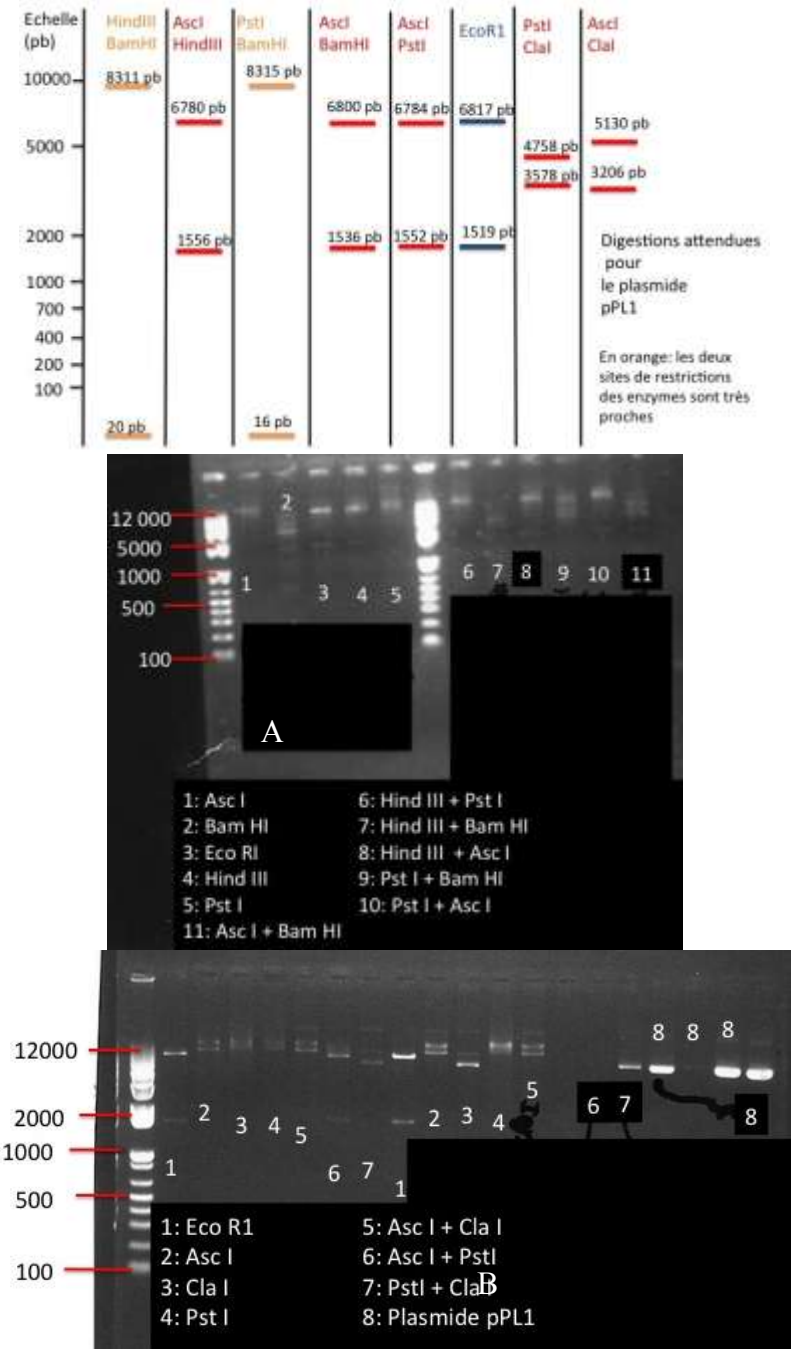


Figure 2.4 : Schéma des résultats attendus (en haut) et photographie de l'électrophorèse des résultats obtenus de la digestion du plasmide pPL1

L'image du haut représente les résultats attendus pour la digestion du plasmide pPL1 par les enzymes *Hind*III/*Bam*HI, *Asc*I /*Hind*III, *Pst*I/*Bam*HI, *Asc*I/*Bam*HI, *Asc*I/*Pst*I, *Eco*RI et *Pst*I/*Cla*I et *Asc*I/*Cla*I. L'enzyme *Eco*RI possède deux sites de restriction sur le plasmide pPL1, il y a donc deux bandes attendues. Les doubles digestions doivent normalement former deux bandes sur le gel.

Sur la photographie du gel d'électrophorèse A : du puits 1 à 5 une seule enzyme a été mise en contact avec le plasmide pPL1. Le puits 3 correspond à l'enzyme *Eco*RI, qui sur ce plasmide a deux sites de restriction. Pour les enzymes 2 (*Asc*I), 3 (*Cla*I), 4 (*Pst*I) un seul site de restriction est normalement présent sur le plasmide pPL1. Du puit 6 à 11, des doubles digestions ont été effectuées (6 : *Hind*III/*Pst*I; 7 : *Hind*III/*BamH*I, 8 : *Hind*III/*Asc*I, 9 : *Pst*I/*Bam*HI, 10 : *Pst*I/*Asc*I, 11 : *Asc*I/*Bam*HI) pour vérifier la cartographie du plasmide, et deux bandes apparaissent sur la photographie du gel d'électrophorèse.
Sur la photographie du gel d'électrophorèse B : du puits 1 à 4 une seule enzyme a été mise en contact avec le plasmide pPL1. Du puits 5 à 7, des doubles digestions ont été effectuées (5 : *Asc*I/*Cla*I, 6 : *Asc*I/*Pst*I, 7 : *Pst*I/*Cla*I) pour vérifier la cartographie du plasmide, et deux bandes apparaissent sur la photographie du gel d'électrophorèse. Le puits 8 correspond au plasmide sans aucune digestion (témoin). Le puits 1 correspond à l'enzyme *Eco*RI, qui sur ce plasmide a deux sites de restriction. Pour les enzymes 1 (*Asc*I), 2 (*Bam*HI), 4(*Hind*III), 5 (*Pst*I) un seul site de restriction est normalement présent sur le plasmide pPL1.

Après cette première transformation, 25 expériences ont été faites pour transformer *S. musiva* (Tableau 2.1, pour les détails de transformations). Il n'a pas été possible d'obtenir à nouveau des transformants pour cette espèce. Le plasmide a été changé, ainsi que la souche bactérienne. Ces deux modifications auraient pu expliquer l'absence de transformants. Par conséquent, la souche de la première expérience a été à nouveau utilisée, GV3101:: pMP90, contenant le plasmide pPL1 (transformé par Philippe Tanguay). La transformation a également été réalisée à nouveau avec GV3101 ::pMP90 ::pPT1. Dans les deux cas, aucune souche résistante n'a été obtenue sur le milieu contenant le fongicide.

La variance des expériences pour la transformation de *S. musiva* est de 71,6, et l'écart-type est de 8,46. Ce chiffre élevé est lié au fait que la majorité des expériences n'a pas fonctionné. Le décompte à l'hématimètre des conidies pour *S. musiva* a donné en moyenne $2{,}7\times10^{8}$ spores/mL, pour les 26 transformations, avec un écart-type de 1,9650 (tableau 2.4). Le nombre moyen de colonies bactériennes était de $1{,}15\text{x}10^{7}$ bactéries (GV3101::pMP90::pPL1) et cette quantité était mise en contact dans les dernières expériences avec *S. musiva.* Les résultats des décomptes de conidies des 26 expériences sont présentés à l'Annexe 5.

Afin de vérifier quelle pourrait être la cause des résultats observés, différents paramètres ont été testés. Nous avons débuté en testant la transformation de C58 avec une autre espèce fongique: le champignon *Ophiostoma novo-ulmi* H327, agent de la maladie hollandaise de l'orme. Ceci afin de vérifier que la souche bactérienne C58 était capable de faire la transformation sur une espèce fongique. La concentration de levures *d'O. novo-ulmi*

était de $7{,}23\times10^{8}$ levures/mL. Le nombre de souches résistantes obtenues avec la souche bactérienne C58 était de 18 colonies, après 7 jours.

Un autre paramètre qui a été testé est la température d'incubation du milieu lors de la période de contact entre la bactérie et le champignon (*S. musiva*): température ambiante, 28°C, puis 26°C, sans que cela ne change le résultat pour *S. musiva*. L'ajout de rifampicine et de gentamycine sur le milieu *IM* a été fait, afin d'avoir une pression de sélection sur *Agrobacterium tumefacien*s, et pour s'assurer du maintien du plasmide *Ti* qui contient les gènes de virulence nécessaires à la transformation. Le nombre de bactéries mis au contact des conidies lors de la transformation a été évalué également par dilution en cascade. Nous avons également mis sur les différentes membranes de cellophane, tout le mélange conidies-bactéries, la recombinaison homologue étant un phénomène rare. Nous avons également vérifié que le champignon était capable de se développer sur du milieu *IM*, par un test de germination sur celui-ci. Par la suite, les conditions de transformation ont été vérifiées. Nous avons étalé 200 conidies sur la membrane de cellophane, et laissé 2 jours, à l'obscurité. Puis, la membrane a été transférée sur le milieu *PDA*, et laissée 7 jours dans le noir, et nous avons décompté les conidies pour déterminer la fréquence de germination (tableau 2.3). Nous avons alors obtenu une fréquence de germination de 81,7% en moyenne. La membrane n'inhibe donc pas la germination de *S. musiva*. Le milieu *IM* n'empêche pas la germination du champignon lorsque celui-ci ne reste que 2 jours sur *IM,* avant d'être transféré sur du milieu *PDA*.

Nous avons également vérifié que le champignon n'était pas tué par la bactérie, en vérifiant le taux de germination de *S. musiva* mis en contact des deux souches d'*Agrobacterium* (tableau 2.2). Nous avons obtenu une fréquence de germination de 8,6% pour C58, et 70,2% pour GV3101. Cependant, lors de la transformation de *Septoria musiva* avec C58, la souche fongique utilisée était repiquée depuis l'expérience 2 jusqu'à l'expérience 10, et sa fréquence de germination était également de l'ordre de 10%, en l'absence de la bactérie (résultats non publiés). Le taux faible n'est donc pas à associer avec la souche utilisée. Tous ces paramètres testés n'ont cependant pas permis d'obtenir des transformants (Les résultats détaillés sont présentés en Annexe 5).

Tableau 2.2 : Fréquence de germination pour les conidies (200) de *Septoria musiva* mises en présence de deux souches d'*Agrobaterium tumefaciens* C58::pMP90 et GV3101::pMP90 (observées à la loupe binoculaire)

	Fréquence de germination des conidies en contact avec C58 ::pMP90[b]	Fréquence de germination des conidies en contact avec GV3101 ::pMP90[b]
Moyenne[a]	8,6%	70,2%
Ecart-type	0,0585	0,1589
Variance	0,0034	0,3986

[a] :Nombre de répétitions pour le calcul de la moyenne: 4 répétitions pour C58 et 8 pour GV3101.
[b] : Les fréquences ont été évaluées en mettant 200 conidies sur milieu *PDA*. Ces conidies ont été mises en commun avec les bactéries lors de la transformation, et correspondent au restant du mélange qui a été dilué pour obtenir 200 conidies.

Tableau 2.3 : Fréquence de germination de 200 conidies de *Septoria musiva* sur membrane de cellophane (observées à la loupe binoculaire)

	Fréquence de germination des conidies sur IM + membrane (7 jours)[a]	Fréquence de germination des conidies 2 jours sur IM et 7 jours sur PDA + membrane[a]
Moyenne	0	81,7%
Ecart-type	0	0,0544
Variance	0	0,2333

[a] : 2 expériences ont été menées sur *IM* seul, et 4 sur *IM+PDA*. Les conidies ont été dénombrées et diluées de façon à en avoir 200 par boîte de Pétri.

Tableau 2.4 : Nombre moyen de conidies de *Septoria musiva* lors des 26 transformations

	Nombre de conidies ($\times 10^8$)[b]
Moyenne[a]	2,7
Ecart-type	3,9
Variance	2,0

[a] : La moyenne a été effectuée sur les 26 expériences de transformation, pour l'espèce *S. musiva*.
[b] : Le nombre de conidies a été évalué pour chaque expérience sous microscope optique, avec une cellule de Neubauer.

Tableau 2.5 : Nombre moyen de conidies de *Septoria populicola* pour les transformations 1 à 5

	Nombre de conidies ($\times 10^7$)[b]
Moyenne[a]	20,5
Écart-type	29,8
Variance	888,3

[a] : Lors d'un des comptages du nombre de conidies, les cultures fongiques avaient été laissées sur le milieu pendant trois semaines, ce qui a donné un nombre de conidies de 6×10^8 conidies/mL. Mais pour les autres transformations, c'était de l'ordre de 10^7 conidies/mL. Ceci explique donc la valeur élevée de la moyenne. La moyenne est calculée sur cinq expériences.
[b] : Le nombre de conidies a été évalué pour chaque expérience sous microscope optique, avec une cellule de Neubauer.

Tableau 2.6 : Nombre moyen de conidies de *Septoria populi* pour les transformations 6 à 11

	Nombres de conidies ($\times 10^{7)}$)[a]
Moyenne[b]	2,6
Ecart-type	2,7
Variance	7,8

[a]: Le nombre de conidies a été évalué pour chaque expérience sous microscope optique, avec une cellule de Neubauer.
[b] : Le nombre de répétition est de 5.

2.4. Discussion

L'Ascomycète *S. musiva* est l'agent causal du chancre septorien sur peuplier hybride, mais il est également responsable de taches foliaires sur peupliers hybrides ou peupliers indigènes, ainsi que sur saule. L'Ascomycète *S. populicola* est quant à lui l'agent causal de taches foliaires sur les peupliers (Feau *et al*., 2010). *S. musiva* et *S. populicola* ont causé par le passé des échecs de plantations dans les années 80, dans les provinces du Québec et de l'Ontario (Ostry et McNabb, 1985; McNabb *et al.*, 1995). Avec le séquençage des génomes à haut débit, il est maintenant possible d'étudier l'interaction hôte-pathogène, pour mettre en place un moyen de lutte efficace sur le long terme.

La bactérie *A. tumefaciens* est une bactérie utilisée pour produire des plantes génétiquement modifiées, mais également pour transformer des champignons filamenteux ou levuriformes. L'utilisation de cet organisme a rendu possible la mise en place d'un système de transformation pour des champignons récalcitrants aux autres techniques de transformation (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). Afin de réaliser des inactivations de gènes, il faut tout d'abord commencer par vérifier que la bactérie est capable de transformer les deux champignons à l'étude: *S. musiva* et *S. populicola.* Pour cela, nous avons émis l'hypothèse que ces deux champignons sont transformables par cette bactérie, et qu'il est possible d'inactiver les gènes dans un second temps, afin d'étudier des gènes d'interêt et ainsi permettre l'étude de l'interaction hôte-pathogène.

Le choix des conidies pour transformer *S. musiva* et *S. populicola* était facilité par la rapidité et la facilité d'obtention. Les conidies sont étalées sur du milieu *PDA* contenant deux antibiotiques : la cefotaxime et le moxalactame, et elles sont laissées pendant 7 jours à température ambiante, dans le noir, afin qu'elles produisent de nouvelles conidies en quantité suffisante pour la transformation. Cependant, pour optimiser la quantité de conidies, un autre milieu a été testé, notamment pour *S. populicola* et *S. populi* : les grains de millet. Ce milieu s'est toutefois révélé moins productif que le milieu *PDA*, puisqu'en moyenne la quantité de conidies était de 10^7 /mL, pour les trois champignons. Le repiquage de *S. musiva* s'est également effectué avec le même individu pendant quatre mois, ce qui a

pu par la suite sélectionner certains phénotypes, qui rendent difficiles la transformation. Par la suite, toutes les deux transformations (soit tous les 15 jours), des conidies conservées à -80°C étaient ensemencées sur du milieu frais pendant 7 jours, puis récoltées et à nouveau ensemencées 7 jours pour une seconde transformation. Cette pratique a pour but d'éviter cette sélection. Un autre matériel qui aurait pu être utilisé chez *S. musiva* et *S. populicola* est les protoplastes. Cependant, les protoplastes chez *S. musiva* ne sont pas faciles à obtenir et à maintenir (Tanguay, communication personnelle). Qui plus est, l'étude menée par Zwier *et al.,* (2001) sur *Zymoseptoria tritici* (anciennement *Septoria tritici,* Stuckenbrock *et al.,* 2012) n'a pas montré de différences significatives entre la transformation avec des conidies et des protoplastes. L'étude menée par de Groot et collaborateurs (1998) montre également que le nombre de transformants sur l'espèce *Aspergillus niger* est du même ordre de grandeur entre les protoplastes et les conidies. Bien qu'il s'agisse, dans ces deux cas, d'espèces différentes par rapport à *S. musiva,* on peut émettre l'hypothèse que l'utilisation de protoplastes n'aurait pas permis d'obtenir plus de transformants. Qui plus est, la transformation a été retestée par Philippe Tanguay, et a donné des transformants pour pPT1 et pPL1*,* avec les conidies de *S. musiva* (Tanguay, résultats non publiés). Cela montre donc que la transformation avec les conidies par *A. tumefaciens* fonctionne.

Lors de la première transformation de *S. musiva*, 44 souches résistantes à l'hygromycine B ont été obtenues et 12 ont été testées par Southern blot. Ces 12 souches se sont révélées être des souches transformées. La transformation par *A. tumafaciens* de *S. musiva* est donc possible. Il était donc attendu que lors des expériences suivantes, d'autres transformants puissent être obtenus. Lors de l'extraction d'ADN des souches résistantes de cette première transformation, deux milieux ont été utilisés pour obtenir du mycélium: le milieu V8, et le milieu minimum utilisé pour la culture d'*Ophiostoma novo-ulmi*, d'après le protocole de Bernier et Hubbes (1990), avec un changement dans la source d'azote : il s'agit dans notre cas de lait en poudre. Le milieu minimum semble plus approprié pour une production de mycélium plus « propre ».

Par la suite, les transformations de *S. musiva* se sont effectuées avec un nouveau plasmide, en l'occurrence le plasmide pPL1. Le premier plasmide utilisé, pPT1, possédait

le gène de résistance à l'hygromycine B, et celui de l'ampicilline. Suite à la vérification de la cartographie du plasmide par des digestions enzymatiques, les résultats ne correspondaient pas à la cartographie attendue. Il a donc été décidé d'utiliser le plasmide pPL1, dont la cartographie attendue était obtenue. Celui-ci possède le gène de résistance à la kanamycine et également le gène de résistance à l'hygromycine B. Pour vérifier que ce ne soit pas un problème de plasmide ou de milieu, l'expérience a été refaite avec pPT1 en parallèle des transformations avec pPL1, sans succès.

La totalité du mélange conidies de *S. musiva*/bactéries a été mise sur boites, sans que cela ne change le résultat. Par la suite, pour vérifier le protocole, l'expérience a été refaite avec *Ophiostoma novo-ulmi* H327. Le nombre de colonies transformantes putatives était de 18. Dans ce cas, le nombre réduit de transformants s'explique par une quantité d'hygromycine B trop élevée suite à une erreur de calcul de concentration. La quantité finale était de 450 μg/mL, le protocole de Tanguay et Breuil (2003) recommandant une concentration de 250 μg/mL.

Plusieurs articles, dont ceux de Michielse *et al.* (2005) et McClelland et Wickes (2009), mentionnent différentes conditions qui peuvent influencer la transformation, ainsi que son efficacité. Tout d'abord, les auteurs mentionnent que pour chaque espèce de champignon, il y a des conditions particulières pour une efficacité maximum de la transformation. Selon ces mêmes auteurs, les paramètres essentiels à une transformation sont : le matériel fongique de transformation de départ, les souches d'*A. tumefaciens* et de champignons utilisées (dans mon cas *S. musiva,* et *S. populicola*), et les conditions de co-cultures. Dans les conditions de co-cultures, Michiesle *et al.* (2005) citent quelques exemples: le ratio bactérie/champignon, la température, le pH du milieu de co-culture, la période de mise en contact entre la bactérie et le champignon, ainsi que le type de membrane sur laquelle est réalisée la co-culture. Nous nous sommes servies de l'article de Michielse et collaborateurs (2005) pour déterminer quelle pourrait être la condition qui ne serait pas respectée dans notre protocole, et qui pourrait expliquer l'absence de transformants.

Lors de la première transformation, le temps d'incubation entre les bactéries et les champignons était de 48h. Lorsque nous avons réalisé la première répétition de l'expérience, le temps d'incubation était de 59 heures. Les auteurs conseillent de ne pas dépasser les 72 heures, au risque d'avoir une quantité de bactéries trop importante sur le milieu (Michielse, *et al*. 2005 ; Islam, *et al.,* 2012). Il y a alors un risque d'inhibition de la germination du champignon, mais également de rendre difficile l'élimination des bactéries par la suite. Le délai de 48 heures a donc été respécté par la suite, mais cela n'a eu aucun effet.

De nombreux auteurs (Covert et *al.,* 2001 ; Michielse *et al.,* 2005 ; Wang et *al.,* 2008 ; Nakamura *et al.,* 2012) mentionnent également la souche bactérienne utilisée. En effet, celle-ci peut avoir un plasmide qui contient des gènes de virulence différents selon la souche utilisée. Dans cette étude, nous avons utilisé deux souches bactériennes: C58 et GV3101. Ces deux souches ne sont pas transformées de la même façon. En effet, la première est transformée par électroporation et la seconde par choc thermique. Les deux possèdent le même plasmide contenant les gènes de virulence: pMP90. Nous avons cependant noté une différence dans la vitesse de croissance, qui pourrait expliquer les problèmes de transformation avec *S. musiva*. En effet, C58 croît beaucoup plus rapidement que son homologue GV3101 (résultats non publiés). On peut donc supposer que le temps d'incubation de 48 heures avec C58 pouvait être trop long. Mais, quand nous sommes revenue à GV3101, le temps d'incubation de 48 heures n'a pas permis d'obtenir de transformants.

Pour la température de co-culture, les milieux contenant le mélange bactéries-conidies ont été laissés à température ambiante dans nos expériences, puis mis dans un incubateur. Dans un premier temps, ces milieux ont été mis dans l'incubateur à une température de 28°C, puis pour les autres transformations, elle a été abaissée à 26°C. La température de 28°C peut être trop élevée pour la transformation (Rho *et al.,* 2001 ; Michielse *et al.*, 2005 ; Islam *et al.*, 2012). L'incubateur a principalement été utilisé pour éviter les écarts de températures pendant les deux jours d'incubation. Michiesle *et al.* (2005), ainsi que McClelland et Wickes (2009) et Islam *et al.* (2012) mentionnent que des

expériences ont été menées et ont permis de déterminer une température optimale de co-culture comprise entre 20 et 28°C. Une température inférieure résulte en une nette diminution du taux de transformants, puisque la température devient trop basse pour la bactérie, alors qu'une température supérieure à 28°C entraîne une perte des gènes de virulence chez *A. tumefaciens.* La température optimale pour la transformation est de 25°C, d'après les auteurs de ces articles (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009 ; Islam *et al.,* 2012). Dans le cas des travaux sur *S. musiva* et *S. populicola*, le changement de température n'a pas permis d'obtenir à nouveau des transformants.

Pour ce qui concerne le ratio bactéries/champignons, le protocole que nous utilisions conseillait un ratio 1/1 pour le volume du mélange bactéries/conidies (de Groot *et al.*, 1998). Une dilution des bactéries était également nécessaire pour atteindre une DO de 0,150. Sur les dernières expériences, nous avons évalué le nombre de bactéries mises en commun avec les conidies (Michielse *et al.,* 2005 ; McClelland et Wickes, 2009). Une dilution en cascade a été effecutée de la culture des bactéries après six heures d'incubation dans le milieu *IM*, soit après la dilution pour atteindre la DO. Ceci a montré qu'en moyenne il y avait $1{,}15\times10^{7}$ bactéries mises en commun avec la souche fongique. En moyenne, dans ces mêmes expériences, $1{,}73\times10^{8}$ conidies ont été décomptées. Il se peut donc que le nombre de conidies trop important inhibe le développement de la bactérie, empêchant le transfert de l'ADN-T. Cependant, ces résultats ne concernent que GV3101, et pas C58. Il se peut donc que la quantité de C58 était trop élevée, ou trop insuffisante pour permettre la transformation.

Pour ce qui concerne la membrane, il s'agit d'une membrane de cellulose, la même que lors de la première transformation. Qui plus est, avec les tests de germination effectués deux jours sur *IM,* puis sept jours sur *PDA*, nous avons pu vérifier que le champignon pouvait se développer sur cette membrane, lorsque le milieu était du *PDA* (tableau 2.3). Cela n'a donc pas du jouer un rôle sur les transformations.

L'absence de transformants pourrait également s'expliquer par une erreur de concentration d'hygromycine B. Cette erreur a été commise pour la transformation d'*Ophiostoma novo-ulmi*, cette espèce nécessitant une concentration en hygromycine B

plus élevée que *S. musiva.* La quantité manquante sur le milieu solidifié pour *O. novo-ulmi* a été ajoutée, avant d'étaler le mélange bactéries-levures. Cependant, la quantité d'hygromycine ajoutée était trop élevée. En effet, une quantité trop importante d'hygromycine B, malgré le gène de résistance, inhibe la croissance du champignon. Mais les calculs ont été vérifiés pour les autres transformations de *S. musiva*, et il n'y a pas d'erreurs à ce point de vue. Les différentes étapes de la transformation ont également été vérifiées.

La rifampicine et la gentamycine jouent un rôle pour le maintien du chromosome de la bactérie, ainsi que pour les gènes de virulence. La transformation a été testée avec l'ajout sur le milieu d'induction (*IM*) solide de ces deux antibiotiques. Mais cela n'a pas changé les résultats.

Dans l'article de Michiesle *et al.* (2005), les auteurs citent des cas où les espèces fongiques ne sont pas transformables avec *A. tumefaciens*. Cela a été le cas pour *Sclerotinia sclerotiorum*, où Rolland *et al.* (2003) n'ont pas pu obtenir de transformants, malgré la vérification des différents paramètres. La seconde espèce, qui a été testée par Michiesle *et al.* (2005) et qui n'a pas pu être transformée est *Aspergillus niger*. Michielse et collaborateurs ont obtenu un faible nombre de transformants, et n'ont jamais pu en obtenir à nouveau, malgré la vérification de chaque paramètre. La transformation d'*A. oryzae pyrG* a également donné des résultats variables, puisque le nombre de transformants variait de 0 à 40 transformants pour 10^6 conidies (Michielse *et al*., 2005).

Pour Michielse *et al.* (2005) et McClelland et Wickes (2009), le manque de renseignements sur l'interaction entre la bactérie et le champignon fait que le protocole n'est pas optimal pour la transformation. En effet, il semble que les mécanismes permettant la transformation des champignons par *A. tumefaciens* ne sont pas encore clarifiés. Selon Michielse *et al.* (2005), certains gènes semblent ne pas être impliqués pour les transformations fongiques, mais essentiels pour les transformations végétales. Ainsi, la protéine VirE2 semble avoir un rôle différent chez la levure, les champignons filamenteux et les plantes. Cette protéine est transportée dans la cellule de l'hôte durant le processus d'infection, et joue un rôle important dans la protection de l'ADN-T contre les nucléases.

L'inactivation de cette protéine a résulté en une sévère diminution de la virulence d'*A. tumefaciens* sur les plantes, mais chez *S. cerevisiae* et *A. awamori,* cela a réduit le nombre de transformants de 10% et 63% respectivement (Bundock *et al*., 1995 ; Michielse *et al.,* 2004). Qui plus est, les protéines VirF, VirG et VirE3 qui sont nécessaires à l'infection de certaines plantes, sont dispensables dans le cas de la transformation de *A. awamori* (Michielse *et al.,* 2004 ; Michielse *et al.,* 2005). La molécule β-1,2-glucan est une molécule synthétisée par le chromosome bactérien, et est nécessaire à la bactérie pour se fixer et donc permet la transformation ultérieure des plantes. Mais l'utilisation de mutants pour cette molécule n'a pas empêché la transformation de *Saccharomyces cerevisiae*, montrant ainsi que ce n'est pas une molécule indispensable pour la transformation de cet Ascomycète (Matthysse, 1983 ; Matthysse, 1987 ; Michielse *et al*., 2005). Les connaissances sur la transformation avec *Agrobacterium* évoluent, mais le transfert de l'ADN-T n'est pas encore complètement compris, ni les paramètres expérimentaux totalement adaptés à toutes les espèces fongiques. D'après Michielse et collaborateurs (2005), cela explique les variabilités de résultats dans les transformations fongiques. Il est donc nécessaire d'étudier l'interaction *Agrobacterium tumefaciens* avec les espèces fongiques pour mettre en place un système de transformation optimale des espèces fongiques.

De plus, dans l'étude menée par de Groot *et al.* (1998), la fréquence des transformants variait entre 1000 et 9000 pour 10^7 conidies en ce qui concerne *Aspergillus awamori*. Pour *A. niger,* les auteurs ont obtenu 5 transformants, une fréquence de 1300 pour *Colletotrichum gloeosporioides*, 25 pour *Fusarium venenatum,* 240 pour *Trichoderma reesei,* 5000 pour *Neurospora crassa* et 5 pour *Agaricus bisporus.* On peut donc constater que, d'une espèce à l'autre, la fréquence des transformants avec un nombre de conidies de l'ordre de 10^7 varie énormément. Dans ces différentes expériences, les auteurs ont également utilisé différentes souches d'*A. tumefaciens*. Généralement, aucune comparaison n'a été menée pour déterminer quelle souche est la plus efficace dans les transformations pour une même espèce (Michielse *et al*., 2005). Quelques expériences ont fait le test de deux ou trois souches d'*A. tumefaciens* sur une même espèce fongique: *Fusarium circinatum, Colletotrichum sansevariae* et *Volvariella volvacea* (Covert *et al.,* 2001 ; Nakamura *et al.,* 2012 ; Wang *et al.,* 2008). Mais, cela n'est pas le cas pour toutes les

études menées sur la transformation avec *Agrobacterium*. Cela reste donc également à déterminer pour optimiser la transformation.

En ce qui concerne *S. populicola*, l'un des facteurs limitants de sa transformation a pu être le manque de conidies. Lors de la première expérience, la quantité était de l'ordre de 10^6 conidies/mL. Le protocole (de Groot, *et al.*, 1998) conseille d'avoir au moins 2×10^8 conidies pour obtenir des transformants. Par la suite, nous avons essayé d'obtenir plus de conidies, d'abord de la souche p02.02b. Cette souche a également été testée sur un milieu différent: les grains de millet. Mais la quantité de conidies était toujours aussi faible. Cela peut provenir soit de la souche, soit de l'espèce en elle-même qui ne sporule pas beaucoup. J'ai testé également d'autres souches (0272A, 0274A, 02116A, 02120A, 02130A, 02139A[13], 02141A, 02150A, 02159A, 01266A, 02169A[13], 02180A, provenant de l'étude de Feau *et al.,* 2005a), mais, aucune production de conidies n'a pu être obtenu. Malgré l'augmentation du nombre de boîtes pour avoir un nombre élevé de conidies (doublement pour *S. populicola*), aucun transformant n'a été obtenu.

Par la suite, une autre espèce a été testée : *S. populi*, sur grains de millet, pour le transformer, sans succès. Ayant eu des problèmes pour obtenir des transformants avec *S. musiva,* nous nous sommes concentrées sur cette espèce pour revenir par la suite à *S. populicola.* En effet, l'incapacité à obtenir à nouveau des transformants chez *S. musiva* pouvait s'expliquer par un problème dans la façon de réaliser la transformation. Dès lors, nous supposons que *S. populicola* ne fait pas partie des espèces fongiques non transformables, mais la quantité de conidies joue possiblement un rôle important pour la transformation, et doit être un des facteurs limitants pour cette espèce.

[13] Il semble après vérification que ces souches soient des *S. musiva*, et non pas des souches de *S. populicola* (Feau *et al*., 2005a)

2.5. Conclusion

Lors de cette première étape, il s'agissait de mettre en place un système de transformation avec *A. tumefaciens,* et de vérifier l'intégration aléatoire des plasmides pPT1, puis pPL1. Lors de la première expérience, 44 souches résistantes à l'hygromycine B ont été obtenues. Les 12 souches testées par Southern blot, étaient toutes des souches transformantes. Par la suite, le plasmide pPT1 a été remplacé par le plasmide pPL1, mais plus aucun transformant n'a été obtenu. Cela ne semble pas lié au plasmide, ni à la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58. En effet, des souches résistantes transformées avec C58 ont été obtenues pour la souche H327 d'*Ophiostoma novo-ulmi.*

Différentes conditions ont été testées : les souches bactériennes et fongiques, le temps de co-culture, la température durant la co-culture ont été testées, mais n'ont pas permis d'obtenir de transformants. Les différents tests effectués ont montré que ce n'est pas un problème de germination de *S. musiva* ou encore un problème lié au milieu d'induction, puisque le champignon peut se développer quand même après deux jours sur ce milieu. L'hypothèse la plus plausible est que le rapport bactéries/cellules fongiques n'était pas de 1/1, la quantité de bactéries n'était pas suffisante pour permettre la transformation. Cependant, ceci a été testé à la fin des expériences, et il est tout à fait possible que cela ne soit pas le cas des transformations du début.

Il est également possible que le protocole ne soit pas optimal pour transformer *S. musiva* et *S. populicola*. Cela a été le cas pour d'autres champignons, comme *A. niger*, où Michielse *et al.* (2005) n'ont pas réussi à obtenir un nombre de transformants important, ni à reproduire ces résultats. Une meilleure connaissance des interactions qui ont lieu entre *A. tumefaciens* et les cellules fongiques pourrait permettre d'améliorer le protocole, et de réaliser les transformations.

Pour ce qui concerne *S. populicola*, un problème qui a pu se poser est le nombre insuffisant de conidies pour obtenir des transformants et ce, malgré l'augmentation du nombre de boîtes de culture. Cela ne veut cependant pas dire que cette espèce n'est pas transformable, puisque nous nous sommes concentrées par la suite sur *S. musiva*, afin

d'obtenir à nouveau des transformants, avec dans l'idée d'y revenir une fois la transformation réussie.

Dès lors, il serait intéressant de tester plusieurs souches d'*A. tumefaciens* pour transformer *S. musiva* et *S. populicola*. Il serait également intéressant de tester différentes souches de ces deux champignons, et différents types de matériels fongiques à transformer : protoplastes, mycéliums ou encore conidies germées. En effet, ceci n'a pas été vérifié lors de mon travail, et pourrait permettre d'obtenir des résultats. Il serait également intéressant de tester différentes températures d'incubation comprises entre 20 et 28°C, ce qui a été rapporté par plusieurs auteurs comme étant la fourchette de température à respecter, avec une température optimale à 25°C pour plusieurs espèces fongiques (Bundock *et al.,* 1995 ; Michielse *et al.*, 2005 ; McClelland et Wickes, 2009 ; Islam *et al.*, 2012). La concentration en acétosyringone (Wang *et al.*, 2008 ; Islam *et al.*, 2012) pourrait également être évaluée. En effet, certains auteurs ont également déterminé pour certaines transformations une concentration optimale, bien que plusieurs d'entre eux utilisent une concentration à 200 µM (Tanguay et Breuil, 2003 ; Wang *et al.,* 2008 ; Islam *et al*. 2012). Enfin, il semblerait opportun de tester des mutants de souches d'*A. tumefaciens*, afin de déterminer quels sont les gènes de virulences indispensables à la transformation de ces deux Ascomycètes, *S. musiva* et *S. populicola.* Cependant, ce test doit s'effectuer une fois que les souches sauvages d'*A. tumefaciens* ont réussi à transformer *S. musiva* et *S. populicola*. Ceci ayant pour but de mettre en place un protocole efficace de la transformation de ces deux champignons par *Agrobacterium tumefaciens.*

Conclusion générale

Dans mon projet de recherche, je devais mettre en place un système de transformation pour les deux espèces que sont *S. musiva* et *S. populicola*. Ces deux agents phytopathogènes du peuplier représentent un danger pour les peupleraies. Qui plus est, ce sont des champignons très peu étudiés. Pour *S. populicola,* cela s'explique par l'absence de symptômes réellement dommageables pour les peupliers. Cependant, pour les deux champignons, une évolution de leur génome est toujours possible. En effet, *S. musiva* a déjà été trouvé sur du saule, en 2001 au Québec. Il a également été rapporté comme présent au Brésil (Feau et Bernier*,* 2004 ; Santos *et al.,* 2010). Quand à *S. populicola,* il a déjà causé des chancres en serres sur du peuplier baumier (Zalasky, 1978 ; Newcombe et Ostry, 2001).

La connaissance des interactions hôtes-pathogènes est primordiale, pour comprendre les mécanismes qui régissent la maladie. L'utilisation des mutants est un outil puissant pour permettre cette analyse. La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* s'est révélée capable de transformer des cellules de champignons appartenant aux différents ordres. Plus d'une soixantaine de champignons ont ainsi pu être transformés avec succès, dont des *Mycosphaerella* (*M. fijiensis,* et *M. graminicola*) (Michielse *et al*., 2005). Cela promettait donc une possibilité de transformation pour *M. populorum* et *M. populicola*.

Les résultats préliminaires ont permis d'obtenir des transformants. Malheureusement, cela n'a pas pu être répété par la suite. Dans l'article publié par Michielse *et al.* (2005), les auteurs ont mentionné l'importance des paramètres du protocole de transformation avec *A. tumefaciens*. Tous les paramètres cités dans l'article ont été testés, sans que cela ne change les résultats. Ces mêmes auteurs citent d'ailleurs l'exemple d'*Aspergillus niger*, dont la transformation a fonctionné une fois, mais n'a pas pu être répétée. Un autre champignon s'est également révélé récalcitrant : *Sclerotinia sclerotiorum*. Dans ce cas précis, les auteurs ont également testé les différents paramètres nécessaires à la transformation, sans plus de résultats.

Dans notre cas, je pense que l'un des facteurs limitants le plus probable a été le nombre de bactéries qui était de l'ordre de $1{,}15\times10^7$ bactéries mises en commun avec les conidies de *S. musiva*, alors que le nombre de conidies était de l'ordre de 10^8. La seconde théorie émise rejoint celle de Michiesle *et al.* (2005) étant que *S. musiva* et *S. populicola* sont transformables par *A. tumefaciens.* Mais le manque d'informations concernant les mécanismes qui régissent la transformation entre *A. tumefaciens* et les cellules fongiques font que le protocole n'est pas assez adapté pour ces espèces récalcitrantes. Dès lors que les connaissances seront améliorées, un meilleur protocole, plus adapté à chaque espèce sera donc plus efficace.

Bibliographie

Abuodeh R. O., Orbach M. J., Mandel M. A. et Galgiani J. N. (2000), *Genetic transformation of Coccidioides immitis facilitated by Agrobacterium tumefaciens, Journal of infectious Diseases*, 181 : 2106-2110

Ausubel F., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (1997*), A short protocol in Molecular Biology, A compendium of Methods from Current Protocols In Molecular Biology*, Third Edition, Wiley Edition, 2: 36-40

Balhadère P. V., Foster A. J., et Talbot N. J. (1999), *Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus Magnaporthe grisea by insertional mutagenesis, Molecular, Plant-Microbe Interactions*, 12 : 129-142

Bastien Y., Gauberville C. (2011), Vocabulaire Forestier : Écologie, gestion et conservation des espaces boisés, AgroParisTech, Forêt Privé Française, Office National des Forêts, 608 pp.

Bernier L., and Hubbes M. (1990), *Mutations in Ophiostoma ulmi induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Canadian Journal of Botany*, 68: 225–231

Bier J. E. (1939), *Septoria canker of introduced and native hybrid poplars, Canadian Journal of Forest Research*, 17 : 195-204

Bigué B., Fortier J., Morissette S. et Couture J. (2011), Le guide de populiculture au Québec, Réseau Ligniculture Québec, 122 pp.

Bölker M., Böhnert H. U., Braun K. H., Görl J. et Kahmann R. (1995), *Tagging pathogenicity genes in Ustilago maydis by restriction enzyme-mediated integration (REMI), Molecular and general genetics*, 248 : 547-552

http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=2746

Briese V. (2002), *Southern blot*, consulté le 24 janvier 2013

Bundock P., Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooykaas P. J. (1995), *Transkingdom T-DNA transfer from Agrobacterium tumefaciens to Saccharomyces cerevisiae, EMBO Journal*, 14 : 3206-3214

Bundock P., van Attikum H., Dulk-Ras A. et Hooykaas P. J. (2002), *Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from Agrobacterium tumefaciens, Yeast,* 19 : 529-536

Callan B. E., Leal I., Foord B., Dennis J. J. and van Oosten C. (2007), *Septoria musiva isolated from cankered stems in hybrid poplar stool beds, Fraser Valley, British Columbia, Pacific Northwest Fungi*, 2 : 1-9

Cangelosi G.A., Ankenbauer R.G. et Nester E.W. (1990), *Sugars induce the Agrobacterium virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein, Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 87 : 6708–6712

Chen X., Stone M., Schlagnhaufer C. et Romaine C. P. (2000), *A fruiting body tissue method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of Agaricus bisporus, Applied and Environmental Microbiology*, 66 : 4510-4513

Christie P. J. (1997), *Agrobacterium tumefaciens T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria, Journal of Bacteriology*, 179 : 3085-3094

Citovsky V., Wong M. L. et Zambryski P. (1989), *Cooperative interaction of Agrobacterium VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process, Proceedings of the National Academy of Sciences,* 86 : 1193-1197

Clough and Bent (1998), *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana, The Plant Journal*, 16 : 735-743

Commission Internationale du peuplier (2008), Activités reliées à la culture et à l'utilisation du peuplier et du saule au Canada, Rapport canadien à la 23e session (Mise à jour 8 décembre 2008) : 51-52; 58

Conseil du Peuplier du Canada (2012), *Poplar and willow cultivation and utilization in Canada 2008-2011 Canadian Country Progress Report, Canadian Report to the 24th IPC Session, Dehradun, India* : 1-94

Covert S. F., Kapoor A., Lee M-H, Briley A. and Nairn J. (2001), *Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of Fusarium circinatum, Mycological Research*, 105 : 259-264

de Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., Beijersbergen, A. G. M. (1998), *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi, Nature Biotechnology*, 16 : 839-842

Dickmann D. I., Isebrands J. G., Eckenwalder J.E., Richardson J. (2001), *Poplar culture in North America, NRC Research Press*, Ontario, 397 pp.

http://genome.jgi-psf.org/Sepmu1/Sepmu1.home.html

DOE Joint Genome Institute Septoria musiva so2202 v1.0 (2010), consulté le 12 janvier 2013

http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Mycosphaerella_populorum/MYCOPP_ds.pdf *Mycosphaerella populorum*, consulté le 5 septembre 2012, prepared by CABI and EPPO for the EU

Etienne J., Clauser E. (2004), Biochimie génétique, Biologie Moléculaire, Masson: 409 pp

http://www.fao.org/DOCREP/004/AC492E/AC492E05.htm
FAO, *Diseases caused by Septoria spp*, (1999), consulté le 5 septembre 2012

Feau N. and Bernier L. (2004), *First Report of Shining Willow as a Host Plant for Septoria musiva, Plant Disease,* 88 : 770

Feau N., Hamelin R.C., Vandecasteele C., Stanosz G.R., Bernier L., (2005a), *Genetic structure of Mycosphaerella populorum (Septoria musiva) Populations in North Central and Northeastern North America, Phytopathology*, 95 : 608-615

Feau N., Weiland J. E., Stanosz G. R. and Bernier L. (2005b), *Specific and sensitive PCR-based detection of Septoria musiva, S. populicola and S. populi, the causes of leaf spot and stem canker on poplars, Mycological Research*, 109 : 1015-1028

Feau N., Hamelin R., Bernier L. (2006a), *Attributes and congruence of three molecular data sets: Inferring phylogenies among Septoria-related species from woody perennial plants, Science Direct*, 40 : 809-829

Feau N., Jacobi V., Hamelin R.C., Bernier L. (2006b), *Screening of ESTs from Septoria musiva (teleomorph Mycosphaerella populorum) for detection of SSR and PCR–RFLP markers, Molecular Ecology Notes*, 6 : 355-358

Feau N., Mottet M. J., Perinet P., Hamelin R.C., Bernier L. (2010), *Recent Advances related to Poplar Leaf spot and canker caused by Septoria musiva, Canadian Journal of Plant Pathology*, 32 : 122-134

Gagné P. (2005), Maladies et ravageurs des arbres à croissance rapide au Québec, Revue de littérature, Réseau Ligniculture Québec : 5-7

Gagné P. (2010), La culture du peuplier hybride : la dispersion des gènes exotiques est-elle un risque ?, Fiche d'information, Réseaul Ligniculture Québec : 4

Gelvin S. B. (2000), *Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51 : 223-256

Ginistry C., Héois B., Jouanin B., Terrasson D., Villar M. (2006), Les Peupliers *In* "Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées", Doré C., Varoquaux F. (eds), INRA, Paris, 1ere édition, p. 533-542

Gyenis L., Anderson N.A., Ostry M.E. (2003), *Biological Control of Septoria Leaf Spot Disease of Hybrid Poplar in the Field, Plant Disease*, 87 : 809-813

Haaren M. J. van, Sedee N. J. , Schilperoort R. A. et Hooykaas P. J. (1987), *Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in Agrobacterium tumefaciens, Nucleic Acids Research*, 15 : 8983-8997

Hartl D. L. et Jones E. W. (2003), Génétique : Les grands principes, édition Dunod (3ème éd.), p. 406-441

Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. et Schilperoort R. A. (1983), *A binary vector strategy based on separation of vir-region and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid, Nature*, 303 : 179-180

Hooykaas P. J. et Beijersbergen A. G. (1994), *The virulence system of Agrobacterium tumefaciens, Annual Review Phytopathology*, 32 : 157-179

Hua-Van A., Hericourt F., Capy F., Daboussi M.-J. et Langin T. (1998), *Three highly divergent subfamilies of the impala transposable element coexist in the genome of the fungus Fusarium oxysporum, Molecular and General Genetics*, 259 : 354-362

Innes L., Marchand L. et Simard S. (2006), La taches des feuilles *In* «Principales maladies des arbres au Québec», Les Publications du Québec, 3ème édition, p. 38

http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/dossiers-de-presse/la-genomique-a-l-institut-pasteur/qu-est-ce-que-la-genomique
Institut Pasteur, Qu'est-ce que la génomique? , dossier de presse, consulté le 12 avril 2013

Institut pour le Développement Forestier (1982), Le peuplier aujourd'hui et demain, Institut pour le développement forestier, Paris, 219 pp.

Islam M. N., Nizam S., Verma P. K. (2012), *A highly efficient Agrobacterium mediated transformation system for chickpea wilt pathogen Fusarium oxysporum f. sp. ciceri using DsRed-Express to follow root colonisation, Microbiological Research*, 167 : 332-338

Jacobi V., Plourde K., Charest P. J. et Hamelin R.C. (2000), *In vitro toxicity of natural and designed peptides to tree pathogens and pollen, Canadian Journal of Botany*, 78 : 455-461

http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/3Introduction/1IntroGenFonc.htm
Jaspard, Génomique fonctionnelle et protéomique : introduction, Université d'Angers, consulté le 25 octobre 2012

Kado C. I. (2000), *The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis, Current Opinion Microbiology*, 3 : 643-648

Khang C. H., Park S. Y., Lee Y. H. et Kang S. (2005), *A dual selection based, targeted gene replacement tool for Magnaporthe grisea and Fusarium oxysporum, Fungal Genetics and Biology,* 42 : 483-492

Krupinsky J.M. (1989), *Variability in Septoria musiva in Agressiveness, Phytopathology*, 79 : 423-416

Leboldus J., Blenis P., Thomas B., Feau N., Bernier L. (2009), *Susceptibility of Populus balsamifera to Septoria musiva: A field study and greenhouse experiment, Plant disea*se, 93 : 1146-1150

Lee L-Y. and Gelvin S. B. (2008), *T-DNA Binary Vectors and Systems, Plant physiology*, 146 : 325-332

Lepoivre P. (2007), Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, de Boeck Université, Bruxelles, 1ere édition, 427 pp.

Liang H., Maynard C.A., Allen R. D., Powell W.A. (2001), *Increased Septoria musiva resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene, Plant Molecular Biology*, 45 : 619-629

Liang H., Catranis C.M., Maynard C.A., Powell W.A. (2002), *Enhanced resistance to the poplar fungal pathogen Septoria musiva in hybrid poplar clones transformed with genes encoding antimicrobial peptides, Biotechnology Letters*, 24 : 383-389

Lo M. H., Abrahamson L. P., White E. H., Manion P. D. (1995), *Early measures of basal area and canker disease predict growth potential of some hybrid poplar clones, Canadian Journal of Forest Research*, 25 : 1113-1118

Luley, C.J., & McNabb, H.S. JR. (1989), *Ascospore production, release, germination and infection of Populus by Mycosphaerella populorum, Phytopathology*, 79 : 1013-1018

Luley, C.J., Tiffany, L.H., et McNabb, H.S. JR. (1987), *In vitro production of Mycosphaerella populorum ascomata, Mycologia*, 79 : 654-658

Matthysse A.G. (1983), *Role of bacterial cellulose fibrils in Agrobacterium tumefaciens infection, Journal of Bacteriology*, 154 : 906-915

Matthysse A.G. (1987), *Characterization of nonattaching mutants of Agrobacterium tumefaciens, Journal of Bacteriology*, 169 : 313-323

McClelland C. M., Wickes B. L. (2009), *Agrobacterium tumefaciens as a molecular tool for the study of fungal Pathogens, In « Applied Mycology »* Rai M., Bride P. D., Cabi.org Ch. 13

Ménétrier, J. (2008), Le peuplier hybride au Québec : une révolution, une évolution, Le naturaliste Canadien, 132 : 46-54

Meyer V., Mueller D., Strowig T. et Stahl U (2003), *Comparison of different transformation methods for Aspergillus giganteus, Current Genetics*, 43 : 371-377

Michielse C.B., Ram A.F.J., Hooykaas P.J.J., van den Hondel C.A.M.J.J. (2004), *Role of bacterial virulence proteins in Agrobacterium-mediated transformation of Aspergillus awamori, Fungal Genetics and Biology*, 45 : 571-578

Michielse C. B., Hooykaas P. J. J., van den Hondel C.A. M. J. J., Ram A. F. J. (2005), *Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi, Current Genetics*, 48 : 1-17

Mikosch T. S., Lavrijssen B., Sonnenberg A. S., et van Griensven L.J. (2001), *Transformation of the cultivated mushroom Agaricus bisporus (Lange) using T-DNA from Agrobacterium tumefaciens, Current Genetics*, 39 : 35-39

http://www.ogm.gouv.qc.ca/infopot_vege_fore.html
Ministère des Ressources Naturelle, Utilisation potentielles des végétaux GM (2011), consulté le 17 octobre 2012

Mohamed R., Meilan R., Ostry M.E., Michler C.H. et Strauss S.H. (2001), *Bacterio-opsin gene overexpression fails to elevate fungal disease resistance in transgenic poplar* (*Populus*), Canadian Journal of Forest Research 31: 268–275

Moller E. M., Bagnweg G., Sandermann H., and Greiger H. H. (1992), *A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues, Nucleic Acids Research*, 20 : 6115-6116

Mottet M.-J., Bussières G. et Vallée, G. (1991), Test précoce pour l'évaluation de la sensibilité des peupliers hybrides au chancre septorien, *Forestry Chronicle*, 67 : 411-416.

Mottet M. J., Lamontagne D., Caron F., Fauchon A., et Perinet P. (2007), *Risk management of Septoria canker in Quebec hybrid poplar plantation, Conference Handbook – 2007 Annual Meeting of the Poplar Council of Canada*, 16–21 Septembre 2007 : 59

Mullins E. D., Chen X., Romaine P., Raina R., Geiser D. M. and Kang S. (2001), *Agrobacterium-Mediated Transformation of Fusarium oxysporum : An efficent Tool For Insertionnal Mutagenesis and Gene Transfer, The American Phytopathological Society*, 95 : 173-180

Nakamura M., Kuwahara H., Onoyama K. and Iwai H. (2012), *Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation for Investigating Pathogenicity Genes of the Phytopathogenic Fungus Colletotrichum sansevieriae, Current Microbiological*, 65 : 176-182

Newcombe, G., Chastagner, G.A., Callan, B.E. et Ostry, M.E. (1995), *An epidemic of Septoria leaf spot on Populus trichocarpa in the Pacific Northwest in 1993, Plant Disea*se, 79 : 212

Newcombe G. (1998), *A review of exapted resistance to diseases of Populus, European Journal of Forest Pathology, 28,* 209–216

Newcombe G., Ostry M. (2001), *Recessive Resistance to Septoria Canker of Hybrid Poplar, Phytopathlogy*, 91 : 1081-1084

Newcombe G., Ostry M., Hubbes M., Périnet P. and Mottet M.J. (2001), *Poplar diseases, In «Poplar culture in North America »*, Dickmann D.I., Isebrands J.G., Eckenwalder J.E., Richardson J. (eds), *NRC Research Press*, Ch. 8

Noble S. M. et Johnson A. D. (2005), *Strains and Strategies for Large-Scale Gene Deletion Studies of the Diploid Human Fungal Pathogen Candida albicans, Eukaryotic Cell*, 4 : 298-309

Ostry, M.E., and McNabb, H.S., Jr. (1985), *Susceptibility of Populus species and hybrids to diseases in the North central United States*, *Plant Disease*, 69 : 755–757

Ostry M.E. (1987), *Biology of Septoria musiva and Marsonnia brunnea in hybrid Populus plantations and control of Septoria canker in nurseries, European Journal for Pathology*, 17 : 158-165

Ostry, M.E., and McNabb H.S. Jr. (1983), *Diseases of intensively cultured hybrid poplars: a summary of recent research in the north central region, General technique Report NC-91, Washington, DC: USDA Forestry Service*

Payne A., GrosJean-Cournoyer M. C., Hollomon D. W. (1998), *Transformation of the phytopathogen Mycosphaerella graminicola to carbendazim and hygromycin B resistance, Current Genetics*, 34: 100-104

Perrinet P. (1999), L'amélioration génétique du peuplier au Québec : 30 plus tard *In* L'amélioration génétique en foresterie : où en sommes-nous ?, Actes du colloque tenu à Rivière-du-Loup : 109-113

Piers K. L., Heath J. D., Liang X., Stephens K. M. et Nester E. W. (1996), *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of yeast, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 : 1613-1618

http://www.protocolpedia.com/sobi2?sobi2Task=sobi2Details&catid=14&sobi2Id=198

Pikaard, *Protocol Pedia*, consulté le 20 janvier 2013

Regensburg-Tuink A.J. et Hooykaas P. J. (1993), *Transgenic N. glauca plants expressing bacterial virulence gene virF are converted into hosts for nopaline strains of A. tumefaciens, Nature*, 363 : 69-71

Rho H. S., Kang S. et Lee Y. H. (2001), *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, Magnaporthe grisea, Molecules and Cells*, 12 : 407-411

Robitaille A. et Saucier J.P. (1998), Paysages régionaux du Québec méridional, Gouvernement du Québec, Ministères des Ressources Naturelles, Publication du Québec, ISBN 2-551-177375, Ste Foy, Qc

Rolland S., Jobic C., Fèvre M. and Bruel C. (2003), *Agrobacterium-mediated transformation of Botrytis cinerea, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences, Current Genetics*, 44 : 164-171

Santos, A. F., Machado, E.B., Stanosz, G. R. and Smith, D. R. (2010), *First report of Septoria musiva in poplar in Brazil, Tropical plant pathology*, 35 : 52-53

Schoonbeek H., Del Sorbo G. et De Waard M. A. (2001), *The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of Botrytis cinerea to the phytoalexin resveratol and the fungicide fenpiclonil, Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 : 562-571

Schrammeijer B., Dulk-Ras A., Vergunst A. C., Jurado J. E. et Hooykaas P. J. (2003), *Analysis of Vir protein translocation from Agrobacterium tumefaciens using Saccharomyces cerevisiae as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3, Nucleic Acids Research*, 31 : 860-868

Sivanesan A. (1990), *Mycosphaerella populorum : Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 988. Kew : Commonwealth Mycological Institute*
Soulères G. (1992), Les milieux de la populiculture, Institut pour le développement Forestier, Paris, 1ere édition, 309 pp.

Southern E. M. (1975), *Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis, Journal of Molecular Biology*, 98 : 503-517

Stanosz J.C., Stanosz G.R. (2002), *A medium to enhance identification of Septoria musiva from poplar cankers, Forest Pathology*, 32 : 145-152

Stefani F. O. P. and Hamelin R. (2010), *Current state of genetically modified plant impact on target and non-target fungi, NRC Research Press*, Dossier environnement, 18 : 441-476

Strobl S. and Fraser K. (1989), *Incidence of Septoria canker of hybrid poplars in eastern Ontario, Canadian Plant Disease Survey*, 69 : 109-112

Stukenbrock E. H., Christiansen F. B., Hansen T. T., Dutheil J. Y., and Schierup M. H. (2012), *Fusion of two divergent fungal individuals led to the recent emergence of a unique widespread pathogen species, Proceeding of National Academy of Science*, 109: 10954-10959

Sweigard J. A., Carroll A. M., Farrall L., Chumley F. G. et Valent B. (1998), *Magnaporthe grisea pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis, Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11 : 404-412

Tagu D. et Moussard C. (2003), Principes des techniques de biologie moléculaire, INRA éditions, 176 pp.

Tanguay P., Breuil C. (2003), *Transforming the sapstaining fungus Ophiostoma piceae with Agrobacterium tumefaciens, Canadian Journal of Microbiology*, 49 : 301–304

Thompson G.E. (1941), *Leaf-spot diseases of poplars caused by Septoria musiva and S. populicola, Phytopathology, 31 :* 241–254

Toro N., Datta A., Yanofsky M. et Nester E. (1988), *Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in Agrobacterium, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85 : 8558-8562

Tzfira T. et Citovsky V. (2002), *Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by Agrobacterium, Trends in Cell Biology, 12 : 121-129*

van Attikum H., Bundock P., Hooykaas P. J. (2001), *Non-homologous end-joining proteins are required for Agrobacterium T-DNA integration, EMBO Journal*, 20 : 6550-6558

Veluthambi K., Ream W. et Gelvin S. B. (1988), *Virulence genes, borders, and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens, Journal of Bacteriology*, 170 : 1523-1532

Vergunst A. C., Schrammeijer B., Den Dulk A., de Vlaam C. M. T., *Regensburg-Tuink A. J., Hooykaas P. J. (2000), VirB/D4-dependent protein translocation from Agrobacterium into plant cells, Science*, 290 : 979-982

Vergunst A. C., van Lier M. C., Dulk-Ras A. et Hooykaas P. J. (2003), *Recognition of the Agrobacterium tumefaciens VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1, Plant Physiology*, 133 : 978-988

Villaba F., Lebrun M.-H., Hua-Van A., Daboussi M. J. et Grosjean-Cournoyer M. C. (2001), *Transposon impala, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus Magnaporthe grisea, Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 : 308 -315

Wang J., Guo L., Zhang K., Wu K. and Lin J. (2008), *Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of Volvariella volvacea, Bioresource Technology*, 99: 8524-8527

Waterman A. M. (1954), *Septoria canker of poplars in United States, U. S. Department of Agriculture Circular* No. 947

Weiland J. E. et Stanosz G. R. (2007), *The histology of Hybrid Poplar Clones Inoculated with Septoria musiva, Plant Disease*, 91 : 1524-1530

Yang D., Bernier L., Dessureault M. (1994), *Biological Control of Septoria Leaf Spot of Poplar by Phaeotheca dimorphospora, Plant Disease*, 78 : 821-825

Zalasky H. (1978), *Stem and leaf spot infections caused by Septoria musiva and S. populicola on poplar seedlings, Phytoprotection*, 59 : 43-50

Zhu J., Oger P. M., Schrammeijer B., Hooykaas P. J., Farrand S. K. et Winans S. C. (2000), *The bases of crown gall tumorigenesis, Journal of Bacteriology*, 182 : 3885-3895

Zupan J., Muth T. R., Draper O. et Zambryski P. (2000), *The transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights, The Plant Journal*, 23 : 11-28

Zwiers L. H. et De Waard M. A. (2001), *Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated gene disruption in the phytopathogen Mycosphaerella graminicola, Current Genetics*, 39 : 388-393

Annexe 1 : La désactivation des gènes ADE2 et PKS par *Knock-out*

Mon deuxième objectif dans mon projet était de réaliser une désactivation des gènes ADE2 et PKS (Annexe 4 pour les cartographies), les plasmides ont été construits, en suivant le protocole présenté dans cette annexe. Ces deux gènes étudiés sont : l'homologue de Polyketide Synthase (PKS) responsable de la production de mélanine et le gène codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'adénine Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (AIR carboxylase, ADE 2). Ces deux gènes, lorsque désactivés, sont très facilement observables au niveau phénotypique. Pour PKS, le champignon n'est plus de couleur noire, mais rose. Qui plus est, la mélanine est connue pour jouer un rôle important chez certains champignons pathogènes dans les mécanismes pathologiques (Lepoivre, 2007), il se peut donc que ce soit le cas pour *S. musiva* et *S. populicola*. La mutation sur le gène ADE 2 était également observable, puisque la souche mutée doit normalement devenir rouge. Par conséquent, cela aurait facilité la sélection des mutants.

A.1.1. Fabrication des plasmides

Pour réaliser le KO, il faut commencer par construire les vecteurs avec les gènes que nous cherchons à muter : l'homologue de PKS et le gène codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'adénine : ADE 2.

Pour construire ces plasmides, le kit *MultiSite Gateway® Technology* d'Invitrogen est utilisé. Cette technique permet d'éviter les étapes de sous-clonages liées aux enzymes de restrictions.

A.1.1.1. *BP reaction*

Dans un premier temps, il faut réaliser des PCR sur les gènes ADE et PKS, ainsi que la résistance à l'hygromycine B. Ceci permet de produire une quantité suffisante d'ADN pour l'insertion dans le vecteur. Les séquences des gènes ont été fournies par Philippe Tanguay. Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes ont été construites à l'aide

du logiciel *Vector NT1* (version 11), fourni par Invitrogen. Les amorces utilisées sont les suivantes (pour l'hygromycine, il s'agit des mêmes amorces que pour la sonde, présenté dans la partie 2.2.5.):

- ADE2 attB1

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTGTCGCTCATAATCCAGACTTTT CAGC

- ADE2 attB2

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGAGCACAAAGCAACATGCACGGC GC

- ADE2 attB3

GGGGACAACTTTGTATAATAAAGTTGTCGAGCCACTCAGCCAACGTCTCGAGT CG

- ADE2 attB4

GGGGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGGGTGCTGGCCTCCACCGAGCACTCCCA CGG

- PKS attB1

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAATCATTTATTTCAGCA ACG

- PKS attB2

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGCCTTGAGGTCTCCAATGGTTG GG

PKS attB3

GGGGACAACTTTGTATAATAAAGTTGCTCCAAATACTGCCGTGATGCCACCCG

- PKS attB4

GGGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGGGTGTGAGGGTGGGTGATGGAGACTGCT TCC

Le programme *PCR* utilisé est le suivant : 98°C 10 minutes, 98°C pendant 15 secondes, 57°C 1 minute, 72°C pendant 1 minutes. Les 3 dernières températures correspondent à un cycle. Il y a 30 cycles. Enfin, il y a une dernière étape de 7 minutes d'extension à 72°C. L'enzyme utilisée est une *TAQ* polymérase classique.

Il faut ensuite lier aux trois gènes des fragments *att*B *att*P. La partie gauche des gènes visés, ainsi que la partie droite reçoivent chacun des fragments. Ces fragments vont permettre de relier le gène au gène de résistance à l'hygromycine B. Mais, cela va

permettre également de les relier au plasmide final. La construction suit la figure présentée ci-dessous (Figure A.1.). Cette étape correspond à ce qui est appelé dans le kit la BP réaction. Elle est réalisée avec les enzymes BP fournies avec le kit. On utilise pour cela le produit *PCR* purifié. La purification se fait à l'aide de TE, et de 30% PEG 8000/30 mM $MgCl_2$, et centrifugé à 13000 *rpm*, 15 minutes. La réaction BP est réalisée dans du TE, et laissée pendant une heure à température ambiante. Le plasmide utilisé est le pDONR™, fourni par Invitrogen, en fonction des fragments utilisés. Le marqueur de sélection est le gène de résistance à la kanamycine.

Pour obtenir une quantité suffisante de vecteurs, ces derniers ont été introduits dans des bacéries *Escherichia coli* (souche DH10 B) par électroporation. Les cellules sont préalablement conservées à -80°C. Elles sont dégelées sur glace. Le volume utilisé est de 40 µL. On ajoute ensuite 1 µL d'ADN (minimum 0,5 µL). Le choc électrique est à 1,8 V. Le S.O.C. est ensuite ajouté, à un volume de 200 µL. Les cellules sont laissées incubées pendant 1 heure, à 37°C, pour leur laisser le temps de reconstruire leur paroi. Elles sont ensuite étalées sur boites de Pétri (LB, contenant 50 µg/mL de kanamycine), et laissées toute la nuit à 37°C.

Les colonies sont ensuite repiquées sur une nouvelle boite de Pétri, en tirant un trait, à l'aide d'un embout. Puis, l'embout est mis dans du milieu LB liquide. Les boites sont mises à 37°C pendant 24 heures. Les milieux liquides avec les colonies sont incubés à 37°C, 24 heures, à 250 *rpm*.

Les plasmides sont ensuite récupérés à l'aide du kit d'extraction miniPrep QIAGEN. La machine utilisée est la QIAcube, fourni par QIAGEN. Le programme suivi est le *DNA QIAprep Miniprep*. Cependant, il n'y a pas de tampon PB utilisé. Une fois l'extraction faite, le produit est vérifié sur gel d'agarose (0,8% d'agarose dans TAE ×1 et 100V, durant 1h). La concentration est également évaluée au Nanodrop. Une fois quantifiés, les produits sont envoyés au séquençage, à la plateforme d'analyse du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL).

A.1.1.2. *LR reaction*

À la fin de la *BP reaction*, il y a trois plasmides qu'il faut relier : la partie gauche et la partie droite du gène d'interêt, ainsi que le gène de résistance à l'hygromycine au milieu. Pour cela, le même kit fourni par Invitrogen est utilisé. Cette fois-ci, les enzymes utilisées sont les enzymes LR clonases. Les conditions suivies sont celles du kit. L'enzyme utilisée est une TOPO isomérase, fournie dans le kit. Le plasmide utilisé est le pPGW. La transformation des *E. coli* se fait également par électroporation, dans les mêmes conditions que celles citées ci-dessus. Le gène utilisé comme marqueur de transformation cette fois-ci est le gène conférant la résistance à la spectinomycine. La concentration utilisée était double, *E. coli* étant résistante à cet antibiotique. Les plasmides sont extraits à l'aide du kit MIDIprep fourni par QIAGEN. Leur concentration est évaluée au Nanodrop. Ils sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

.

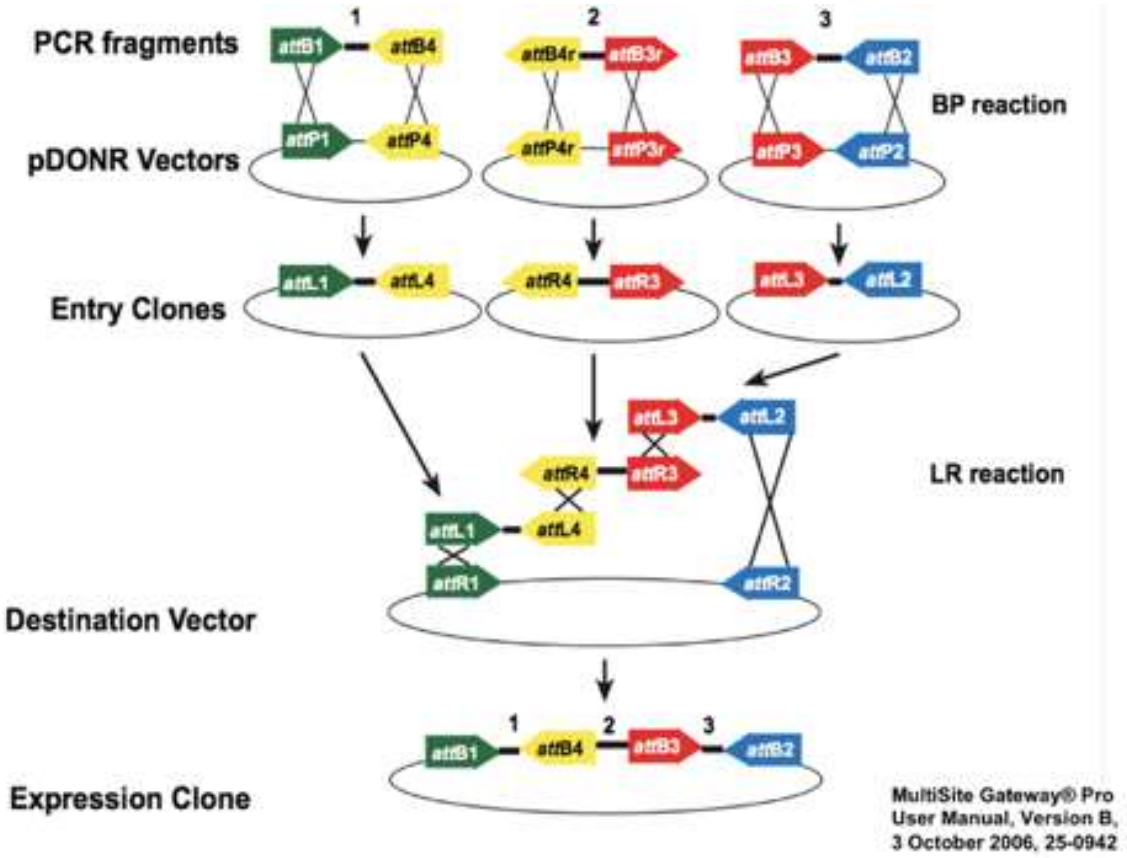


Figure A.1 : Principe du kit *MultiSite Gateway*® d'Invitrogen

A.1.1.3. Souches bactériennes

Les bactéries sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation, et sont transformées chimiquement. Elles sont dégelées sur glace. Puis, un volume de 10 µL d'ADN des gènes ADE2 et PKS est utilisé. Cela correspond à une concentration d'environ 800 ng/µL. Les bactéries sont ensuite mises 4 minutes à 37°C. Puis, on ajoute 500 mL de milieu YEP, et elles sont laissées à 28°C, durant 3 heures. Une centrifugation est faite à 13 000 *rpm,* pendant 25 secondes. Le surnageant est jeté. Les cellules sont re-suspendues dans 200 µL de milieu YEP. Elles sont ensuite étalées sur boite de Pétri contenant du milieu YEP, de la gentamycine (20 µg/mL), de la rifampicine (25 µg/mL) et de la spectinomycine (42 µg/mL). Elles sont ensuite laissées à 28°C pendant 2 jours.

Bibliographie :

Lepoivre P. (2007), Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, de Boeck Université, Bruxelles, 1ere édition, 427 pp.

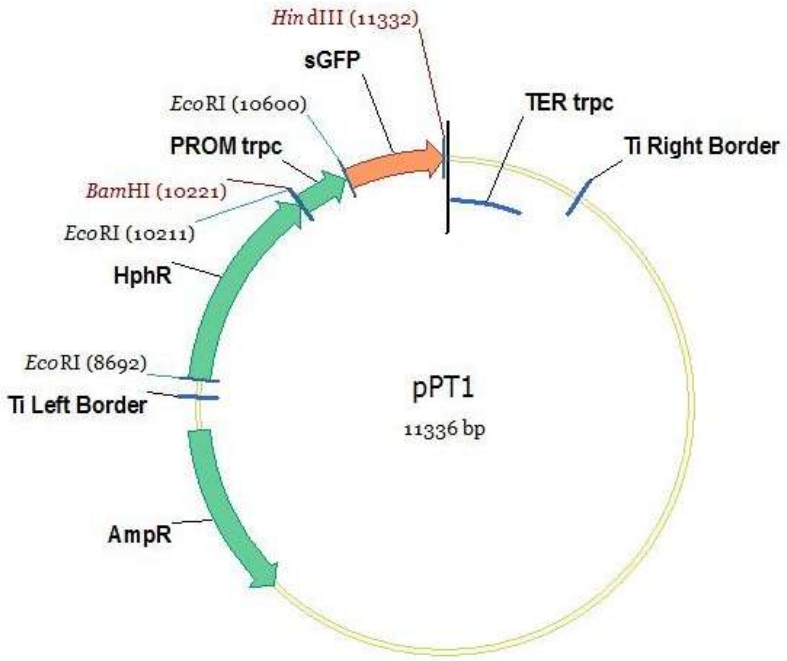
Invitrogen, mise à jour 2011, consulté le 17 octobre 2012, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/multisite%20gateway%20pro_man.pdf.

Annexe 2 : Composition des milieux utilisés

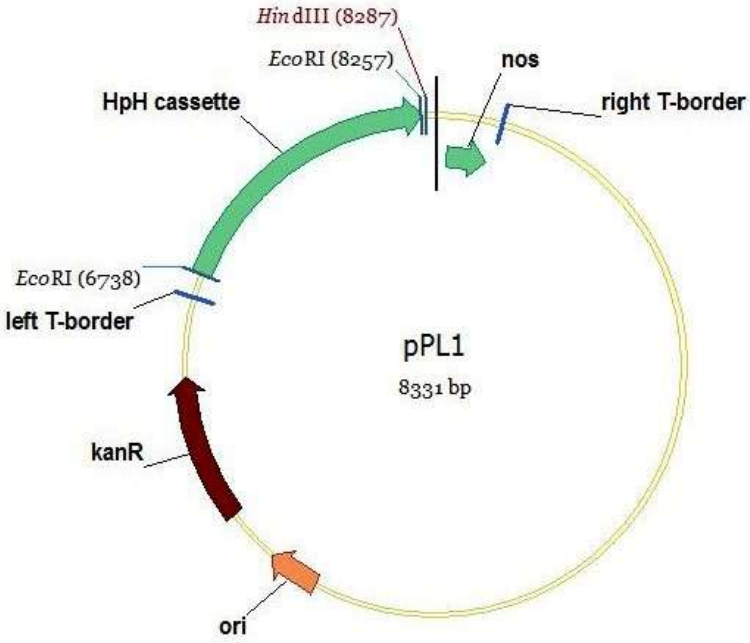
Milieu minimum pour 1L	
K-Buffer	10 mL
M-N	20 mL
$CaCl_2$ 1%	1 mL
Glucose 20%	10 mL
$FeSO_4$ 0,01%	10 mL
Spore Element	5 mL
NH_4NO_3 20%	2,5 mL
Induction Medium pour 1L	
K-Buffer	10 mL
M-N	20 mL
$CaCl_2$ 1%	1 mL
$FeSO_4$ 0,01%	10 mL
Spore Element	5 mL
NH_4NO_3 20%	2,5 mL
Glycérol 50%	10 mL
MES 1M	40 mL
Glucose 2M	5 mL
Acetosyringone 100mM	2 mL
Ajouter 15g/L d'agar pour le milieu solide	
Co-cultivation medium : même que IM, ajouter 1,5% Agar	
Salt Minimum Medium (1L) (Hubber et Bernier, 1990)	
Macroelements Solution stock :	100 mL
Microelements Solution stock :	1 mL
Nitrogen and Carbone source : Difcol skim milk :	30g
$FeCl_3 \times 6H_20$ (20 mg/100 ml) 0.002% :	1 mL
dH_2O :	to 1 L
Adjust the pH to 6.6 with NaOH 5 N ***Autoclave 20 minutes, 121 °C, 15 psi***	
Macro-element Solution (1 L) :	
KH_2PO_4 (Potassium phosphate) :	10 g
$MgSO_4*7H_2O$ (Magnesium sulfate heptahydrate) :	5 g
$CaCl_2*2\ H_2O$ (Calcium chloride dihydrate) :	1 g

d H_2O :	to 1 L
Micro-element Solution (100 mL)	
$CuSO_4$*5H_2O (Copper sulfate pentahydrate) :	4 mg
BO_3H_3 (Boric Acid) :	50 mg
$ZnSO_4$*7H_2O (Zinc sulfate heptahydrate) :	40 mg
$MnSO_4$*H_2O (Manganese sulfate monohydrate) :	40 mg
$NaMoO_4$*2H_2O (Sodium molybdate dihydrate) :	20 mg
dH_2O :	to 1 L
LB (1 L)	
NaCl :	10 g
Tryptone :	10 g
Yeast Extract :	5 g
YEP (1L)	
Peptone :	10 g
NaCl :	10 g
Yeast Extract :	5 g
2×YT (1L)	
Tryptone :	10 g
NaCl :	10 g
Yeast Extract :	5 g

Annexe 3 : Cartes du plasmide pPT1 et pPL1

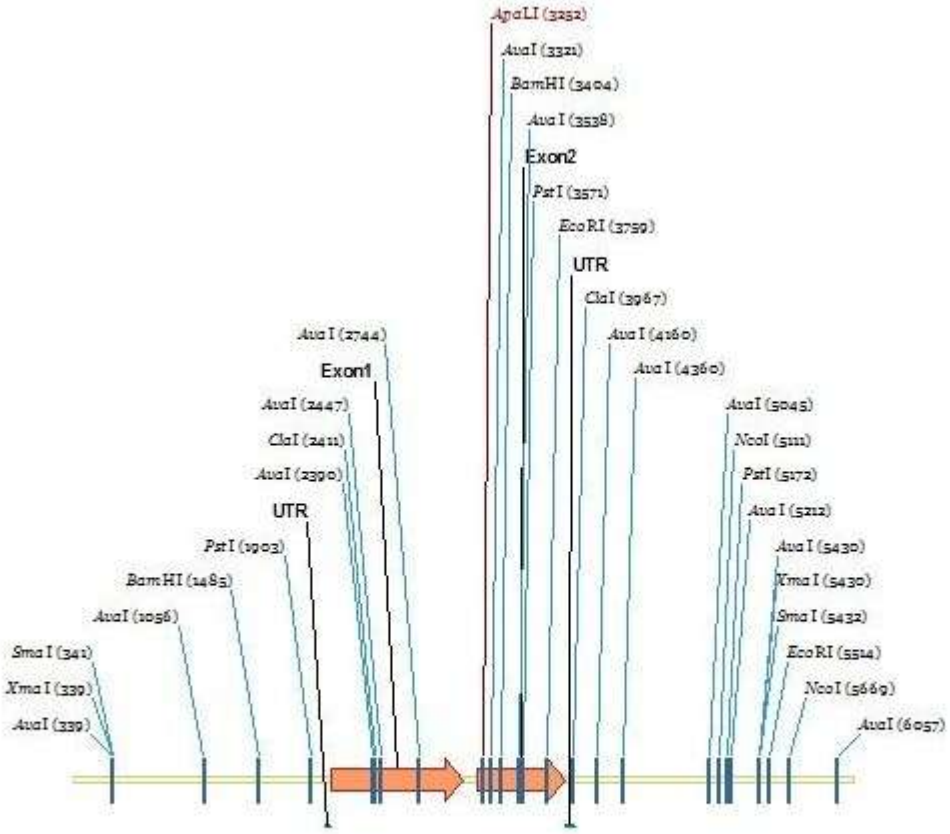


Logiciel utilisé:
Invitrogen NTI, version 11.0



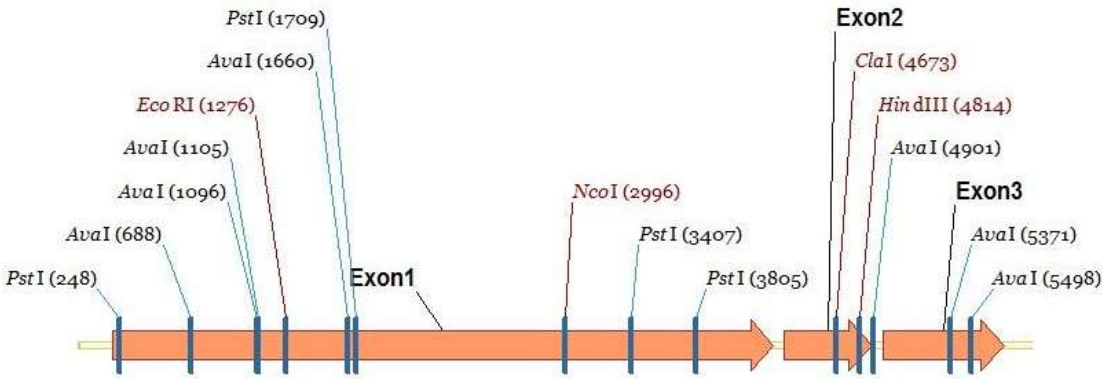
Logiciel utilisé:
Invitrogen NTI 11.0

Annexe 4 : Cartes des gènes ADE2 et PKS



Septoria musiva ADE2 149234

6173 bp



Septoria musiva PKS 57748

5900 bp

Annexe 5 : Données des transformations pour *Septoria musiva*, *Septoria populicola*, *Septoria populi*

Expérience numéro	Espèces fongiques	Nombre de conidies moyen (10^8 conidides/ mL)	Nombre moyen de bactéries (10^7)	Souches d'*Agrobacterium tumefaciens*	Fréquence de germination (FG) PDA	FG sur IM 2 jours + PDA 7 jours
1	***Septoria musiva***	1	NE[a]	GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
	S. populicola	0,02				
2	***S. musiva***	Aucun dénombrement	NE	GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
	S. populicola					
3	***S. musiva***	1,9	NE	C58 ::pMP90 ::pPL1	NE	NE
	S. populicola	0,9				
4	***S. musiva***	1,9	NE	C58 ::p	ND	NE

	S. populicola	0		MP90 ::p PL1		
5	***S. musiva***	5,3	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1	ND	NE
	S. populicola	6,5				
6	***S. musiva***	[b]Aucun Dénombrement	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1	0,04	NE
	S. populi	0,6				
7	***S. musiva***	0,93	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1	0,1625	NE
	S. populi	0,16				
8	***S. musiva***	3,3	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1	0,04	NE
	S. populi	0,21				
9	***S. musiva***	3,7	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1	0,1	NE
	S. populi	0,0006				

10	***S. musiva***	2,7	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
	S. populi	0				
11	***S. musiva***	0,81	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
	S. populi	0,6				
12	***S. musiva***	6,4	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
	Ophiostoma novo-ulmi	7,23[c]				
13	***S. musiva***	1,05	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE

14	***S. musiva***	1,58	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
15	***S. musiva***	1,54	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
16	***S. musiva***	2,88	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
17	***S. musiva***	1,63	NE	C58 ::p MP90 ::p PL1 GV3101 ::pMP90 ::pPT1	NE	NE
18	***S. musiva***	1,48	NE	GV3101 ::pMP90	NE	NE

				::pPL1		
19	***S. musiva***	1,65	NE	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	0,11	NE
20	***S. musiva***	3,05	NE	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	0,35	NE
21	***S. musiva***	1,5	NE	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	0,65	NE
22	***S. musiva***	0,6	NE	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	1,41[1]	NE
23	***S. musiva***	1,12	NE	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	0,27	NE
24	***S. musiva***	2,7	0 après 2 jours, colonies nombreuses après 7 jours	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	0,93	0,98

25	***S. musiva***	2,75	2	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	0,98	0,65
26	***S. musiva***	2,7	1,3	GV3101 ::pMP90 ::pPL1	0,93	0,625

[1] : erreur de calcul lors de la dilution en cascade pour déterminer le nombre de bactéries.
[a] : NE : non évaluée.
[b] : Aucun Dénombrement : aucun dénombrement effectué lors de l'expérience.
[c]: dans le cas d'*Ophiostoma novo-ulmi*, il s'agit du nombre de levures, et pas du nombre de conidies.