



**HAL**  
open science

# Analyse de gènes potentiellement impliqués dans la résistance basale du pommier à *Venturia inaequalis*

Anne-Sophie Poisson

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Poisson. Analyse de gènes potentiellement impliqués dans la résistance basale du pommier à *Venturia inaequalis*. Sciences agricoles. 2013. dumas-00906438

**HAL Id: dumas-00906438**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00906438v1>**

Submitted on 19 Nov 2013

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

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



**AGROCAMPUS OUEST**

**CFR Angers**

2 rue André Le Nôtre

49045 Angers

**INRA centre Angers**

32 rue Georges Morel

49070 Beaucouzé

Mémoire de Fin d'Etudes

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques,  
Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2012-2013

Spécialisation ou option : Gestion Durable du Végétal

**Analyse de gènes potentiellement impliqués dans la résistance basale  
du pommier à *Venturia inaequalis***

Par : Anne-Sophie POISSON

*Volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option/spécialisation\**

Bon pour dépôt (version définitive)

Ou son représentant

Date ; .../.../... Signature :

Autorisation

de diffusion : Oui  Non

***Devant le jury :***

Soutenu à Angers le : 10/09/13

Sous la présidence de : Josiane LECORFF

Maître de stage : Emilie VERGNE-GAILLARD

Enseignant référent : Alexandre DEGRAVE

Autres membres du jury : M. Berruyer, M. Chen et Mme Chevreau

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent  
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".*

## ***Fiche de diffusion du mémoire***

A remplir par l'auteur<sup>(1)</sup> avec le maître de stage.

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

### **Préciser les limites de la confidentialité<sup>(2)</sup> :**

➤ Confidentialité absolue :  oui  non

*(ni consultation, ni prêt)*

↳ Si oui  1 an  5 ans  10 ans

➤ A l'issue de la période de confidentialité **ou** si le mémoire n'est pas confidentiel, merci de renseigner les éléments suivants :

Référence bibliographique diffusable<sup>(3)</sup> :  oui  non

Résumé diffusable :  oui  non

Mémoire consultable sur place :  oui  non

Reproduction autorisée du mémoire :  oui  non

Prêt autorisé du mémoire :  oui  non

.....  
Diffusion de la version numérique :  oui  non

↳ Si oui, l'auteur<sup>(1)</sup> complète l'autorisation suivante :

*Je soussigné(e) \_\_\_\_\_, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.*

*Date :*

*Signature :*

**Angers, le**

**Le maître de stage<sup>(4)</sup>,**

**L'auteur<sup>(1)</sup>,**

**L'enseignant référent,**

---

*(1) auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études*

*(2) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.*

*(3) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé.*

*(4) Signature et cachet de l'organisme.*

Je remercie tout d'abord Charles-Eric Durel de m'avoir accueillie dans l'équipe ResPom et d'avoir été disponible pour répondre à mes interrogations.

Je remercie, Elisabeth Chevreau, aux multiples casquettes. Précédente directrice d'unité, et responsable du sous-groupe « transfofruit », merci de m'avoir permise de travailler durant ces deux dernières années au sein de cette chaleureuse équipe. Je la remercie également en tant que maître de stage temporaire, pour son encadrement, ses conseils et son soutien permanent. Je remercie également Emilie Vergne-Gaillard, qui a fait preuve d'une grande disponibilité tout au long de ce stage, pour tout ce que j'ai appris cette année et pour son écoute lorsque j'en avais besoin.

Je remercie Patricia et Raphaël pour leur transfert de connaissance, à l'origine de ce que je connais aujourd'hui sur la culture in vitro et la biologie moléculaire. Surtout merci, pour votre accueil dans l'équipe, votre gentillesse, votre bonne humeur et votre écoute (surtout Patricia pour qui j'ai été un vrai moulin à parole). Je remercie Laura, pour sa gentillesse et pour cette petite lumière qu'elle m'a apportée dans les moments d'incertitude, seule dans le laboratoire de « biomol ».

Un grand merci à Sylvain Gaillard, pour son œil d'expert et ses nombreux cours en bio-informatique grâce auxquels je suis maintenant, non plus une non-initiée, mais une débutante avertie.

Je remercie également Fabrice, qu'on remercie toujours pour son aide en statistiques mais que je remercierais avant tout pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Merci aux stagiaires et à Emmanuelle, pour tous ces moments de rire mais également pour ces cours accélérés de génomique, rendant le « jargon technique » moins « jargon » et plus « technique ».

Je remercie toutes les personnes de l'IRHS et surtout du bâtiment pour leur aide, leurs conseils et leur gentillesse durant ces deux ans.

Enfin, je remercie mes parents et ma sœur pour leur amour et leur soutien ainsi que Tom d'être tous les jours à mes côtés, à m'épauler.

A mon frère, qui me manque

1.	INTRODUCTION.....	1
1.1.	Structure d'accueil.....	1
1.2.	Le pathosystème pommier / <i>Venturia inequalis</i> .....	1
1.3.	Contexte scientifique et problématique du stage.....	3
2.	BIBLIOGRAPHIE.....	4
2.1.	La résistance des plantes aux agents pathogènes .....	5
2.1.1.	Les différents phénotypes de résistances .....	5
2.1.1.1.	La résistance non-hôte.....	5
2.1.1.2.	La résistance hôte .....	5
2.1.2.	Les mécanismes moléculaires de la résistance des plantes .....	6
2.1.2.1.	Les défenses préformées .....	6
2.1.2.2.	Les défenses inductibles.....	6
2.1.3.	Relation phénotype/ mécanismes moléculaires.....	8
2.2.	Les mécanismes de défense de la PTI.....	8
2.2.1.	De la reconnaissance de l'agent pathogène aux réactions de défense.....	8
2.2.1.1.	La reconnaissance du pathogène par la plante .....	8
2.2.1.2.	La transduction du signal .....	9
2.2.1.3.	Les défenses déclenchées par les PAMPs/DAMPs.....	10
2.2.2.	Les PRRs et la voie de transduction du signal associé.....	10
2.2.2.1.	Les PRRs et leurs corécepteurs chez les plantes .....	10
2.2.2.1.1.	Les PRRs identifiés dans la reconnaissance des bactéries .....	10
2.2.2.1.1.1.	Les LRR-RLK .....	10
2.2.2.1.1.2.	Les LysM-RLP et LysM-RLK .....	11
2.2.2.1.2.	Les PRRs identifiés dans la reconnaissance des champignons .....	12
2.2.2.1.3.	Les PRRs identifiés dans la reconnaissance des DAMPs .....	13
2.2.2.1.4.	Le co-récepteur BAK1 .....	14
2.2.2.2.	Les MAPKs et les WRKYs dans la transduction du signal lors d'une PTI ...	16
3.	MATERIEL ET METHODES .....	17
3.1.	Bioanalyses.....	17
3.1.1.	Recherche de gènes homologues.....	17
3.1.2.	Dessin des amorces .....	18
3.2.	Matériel biologique .....	18

3.2.1. Le couple hôte/agent pathogène .....	18
3.2.2. Inoculation et prélèvements .....	19
3.3. Analyses moléculaires .....	19
3.3.1. Extraction d'ARN .....	19
3.3.2. Extraction d'ADN .....	19
3.3.3. La transcription inverse .....	20
3.3.4. PCR sur ADN .....	20
3.3.5. PCR quantitative .....	20
3.3.5.1. Spécificité et efficacité des amorces .....	21
3.3.5.2. Expression des gènes candidats par PCR quantitative .....	21
3.4. Analyse des données qPCR.....	22
3.5. Analyse statistiques .....	23
4. RESULTATS.....	24
4.1. Les gènes récepteurs et de signalisation impliqués dans la résistance basale.....	24
4.2. Les gènes du pommier potentiellement homologues aux gènes récepteurs et de signalisation impliqués dans la résistance basale .....	25
4.3. Analyse de l'expression des gènes candidats par qPCR .....	26
4.3.1. Pureté et homogénéité des échantillons ADN et ADNc.....	27
4.3.2. Spécificité et efficacité des couples d'amorces .....	27
4.3.2.1. Sélection des meilleurs couples d'amorces.....	27
4.3.2.2. Vérification de la spécificité des couples d'amorces par PCR sur ADN .....	28
4.3.2.3. Spécificité des couples d'amorces et efficacité par qPCR .....	29
4.3.3. Analyse de l'expression des gènes candidats par qPCR .....	30
4.3.3.1. Stabilité des gènes de référence .....	30
4.3.3.2. Niveau d'expression des gènes candidats .....	30
5. DISCUSSION.....	33
5.1. Le déclenchement de la PTI.....	34
5.2. Expression préformée des gènes chez 'Fiesta' et 'Gala' .....	34
5.3. Les récepteurs de PAMPs bactériens .....	34
5.4. Répression post-inoculation .....	34
5.5. Le porte-greffe 'MM106' .....	35
5.6. Les récepteurs de DAMPs.....	35

6. PERSPECTIVES .....	36
6.1. Perspectives à court et moyen termes : améliorations techniques .....	36
6.2. Perspectives à plus long terme : analyse de la résistance basale chez <i>V. inaequalis</i> et <i>Erwinia amylovora</i> .....	37
7. CONCLUSION .....	37
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	39
ANNEXE I .....	I
ANNEXE II .....	II
ANNEXE III .....	III

## **1. INTRODUCTION**

### 1.1. Structure d'accueil

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) est un institut de recherche public créé en 1946. Aujourd'hui parmi les leaders européens de la recherche agronomique, l'INRA a pour vocation de mener des recherches 1) pour une alimentation saine et de qualité, 2) pour une agriculture compétitive et 3) pour un environnement préservé et valorisé. L'INRA est constitué de 13 départements scientifiques et de 17 centres de recherche régionaux (selon le rapport d'activité 2012). L'institut entretient des liens privilégiés avec le secteur privé au travers de contrats de recherche, de développement de plateformes technologiques et de la valorisation des résultats de recherche sous forme de Certificats d'Obtention Végétale ou de brevets. Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2012, une nouvelle structure de recherche a vu le jour sur Angers : l'UMR (Unité Mixte de Recherche) IRHS, pour Institut de Recherche en Horticulture et Semences. Elle associe les personnels de trois tutelles, l'INRA, l'école Agrocampus Ouest et l'université d'Angers. Les équipes de l'institut possèdent des compétences en génétique et horticulture, en pathologie végétale, en physiologie moléculaire des semences et en sciences agronomiques appliquées à l'horticulture. L'objectif de l'IRHS est d'acquérir une renommée internationale dans ces domaines. Quatre axes de recherche sont traités dont l'interaction plantes-agents pathogènes. Cet axe de recherche regroupe cinq équipes. Parmi elles, l'équipe « Résistance du pommier-poirier aux bio-agresseurs » (ResPom) se compose de généticiens, de génomiciens, de pathologistes et d'entomologistes qui cherchent à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance génétique du pommier et du poirier aux bio-agresseurs. Le but est de caractériser les bases génétiques et moléculaires de la résistance, pour mieux trouver des alternatives aux produits phytosanitaires. Par sa collaboration avec les équipes EcoFun, FruitQual et VaDiPom, ResPom participe également à l'axe de recherche « connaissance et exploitation de la diversité génétique » de l'IRHS. J'ai travaillé durant deux ans en tant qu'apprentie ingénieur au sein de l'équipe ResPom.

### 1.2. Le pathosystème pommier / *Venturia inequalis*

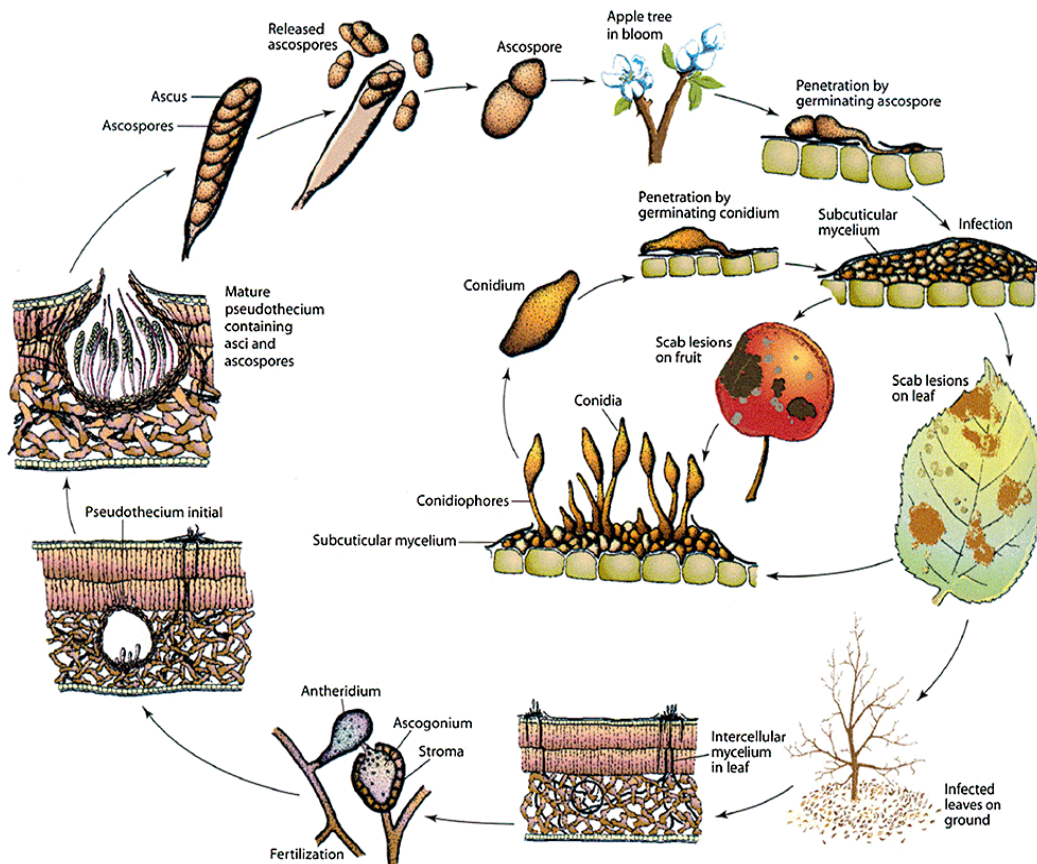
La pomme est le fruit le plus consommé en France avec près de 18 kg par an et par ménage. Cela correspond à 20,3% en volume des parts de marché devant les bananes (14,6%) et les oranges (12,4%). Avec une production de 1 655 000 tonnes en 2011, la France est le troisième producteur de pomme de l'union européenne qui totalisait une production de 9,8 millions de tonnes en 2010. Près de 43% de la pomme produite en France est destinée au marché français tandis que 38% est destinée à l'exportation et le reste à la transformation [5].

L'intérêt économique de cette production justifie l'investissement de l'IRHS sur le pommier. En effet, le pommier cultivé *Malus x domestica* Borkh, de la famille des Maloïdées, est soumis à la pression de nombreux parasites tels que le puceron cendré, le psylle du pommier, l'oïdium, la tavelure du pommier ou encore le feu bactérien. Pour contrôler ces maladies en verger de production, plus d'une trentaine de traitements sont réalisés chaque année, dont 40% pour contrôler la seule tavelure du pommier (cité par Lauri *et al.*, 2011). *Venturia*



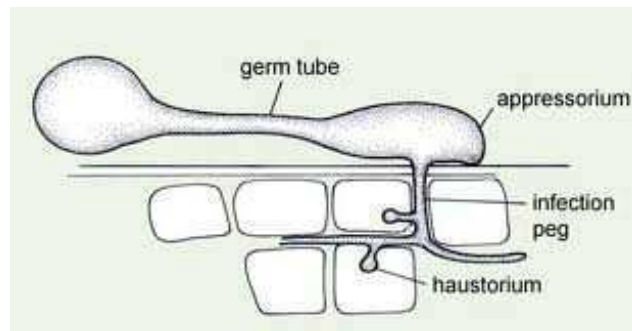
# Introduction

*inaequalis* est un champignon ascomycète hémibiotrophe, agent de la tavelure du pommier (pour revue : Bowen *et al.*, 2011). Son cycle de vie est présenté figure 1.



**Figure 1.** Cycle de vie de *Venturia inaequalis* (tiré de Bowen *et al.*, 2011)

Il passe l'hiver sous forme de périthèces, des organes de reproduction sexuée, dans la litière des feuilles mortes tombées au sol. Au printemps, lorsque la température et l'humidité sont favorables, les ascospores produites par les périthèces, sont libérées, puis projetées par les éclaboussures de pluie ou portées par le vent sur les organes verts des pommiers. Ces ascospores vont alors développer un tube germinatif qui va traverser la cuticule des tissus soit directement soit à l'aide d'un appressorium (Figure 2 ; pour revue : Bowen *et al.*, 2011).



**Figure 2.** Pénétration du champignon dans les tissus végétaux. La spore germe et forme un appressorium qui permet au champignon de traverser la cuticule (<http://www.waternut.org>).

---

## Introduction

---

Le champignon développe alors une structure pseudo-parenchymateuse, nommée stroma, à partir de laquelle vont se différencier un mycélium sous-cuticulaire puis des conidiophores portant à leur extrémité les conidies (spores asexuées) (Figure 1). Les conidiophores et conidies forment les symptômes observés sur les organes infectés du pommier. Les conidies sont alors dispersées par la pluie et le vent, engendrant une infection secondaire des arbres avoisinants pendant la période de développement des fruits (pour revue : Bowen *et al.*, 2011). La tavelure du pommier est la maladie la plus importante en termes de coût économique de contrôle. En effet *V. inaequalis* est un champignon de spectre géographique large, présent dans presque tous les vergers commerciaux. Ce champignon tue rarement son hôte, mais un niveau d'infection très bas suffit à rendre les pommes non commercialisables (pour revue : Bowen *et al.*, 2011). Il cause des lésions brunâtres sur les feuilles, sur les bourgeons et surtout sur les fruits (Figure 3) et bien qu'il ne produise pas de toxines, ces attaques dégradent l'aspect de la pomme, alors dénigrée par les consommateurs.



**Figure 3.** Symptômes sur pommier de l'infection par *V. inaequalis* : sur fruits à gauche et sur feuilles à droite (photographies de C.E Durel, 2008).

Afin de maintenir la production tout en limitant l'utilisation de produits phytosanitaires, comme la France s'est engagée à le faire avec le Grenelle de l'environnement et le plan EcoPhyto2018, une des solutions proposées est la création de variétés résistantes aux agents pathogènes. Des gènes de résistance majeurs ont été découverts chez plusieurs espèces sauvages apparentées au pommier cultivé. Caractérisé en 1943, le gène *Vf* issu de l'espèce *Malus floribunda* (Hough, 1944) est présent aujourd'hui chez plus de 80% des variétés résistantes à la tavelure, au plan mondial, telles que la variété 'Ariane', inscrite au catalogue par l'INRA en 2003. Cependant, cette résistance est monogénique et donc a priori facilement contournable par l'agent pathogène. C'est pourquoi les chercheurs conduisent des recherches d'amont pour mieux connaître la diversité génétique du champignon et sa capacité d'adaptation, et s'orientent vers l'analyse de résistances polygéniques, susceptibles d'être plus difficiles à contourner par l'agent pathogène et donc plus durables (Durel *et al.* 2007).

### 1.3. Contexte scientifique et problématique du stage

Le projet ARAMIS (Apple partial Resistance durability Assessed through Metabolic pathways and pathogen adaptation to Selective pressures) est un projet porté par l'équipe ResPom en partenariat avec l'équipe EcoFun et le LAREMA (Laboratoire Angevin de REcherche en MATHématique). Ce projet a pour objectif d'analyser des résistances *a priori*

## Bibliographie

---

génétiqnement durables et de mettre en évidence des indicateurs de durabilité. La résistance partielle est une résistance globalement considérée comme plus durable que la résistance complète. En effet, contrairement à celle-ci, elle est définie comme une combinaison de multiples mécanismes de défense et donc théoriquement plus difficilement contournable par l'agent pathogène. Chez la pomme, plusieurs QRLs (Quantitative Resistance Loci) ont été identifiés et caractérisés contre la tavelure du pommier, en particulier chez la variété 'Fiesta' (Durel *et al.*, 2003 ; Calenge *et al.*, 2004 ; Soufflet-Freslon *et al.*, 2008). Cependant, aucune connaissance sur les mécanismes moléculaires contrôlés par les QRLs de 'Fiesta' (de la reconnaissance au déclenchement des défenses préformées et inductibles ; Vergne *et al.*, 2010) n'est actuellement disponible. On ne sait pas notamment si 'Fiesta' développe une résistance dite « basale ». La résistance basale existe *a priori* chez toutes les espèces végétales (Jones et Dangl, 2006) et si l'on suppose que les gènes sont en majorité conservés d'une espèce à l'autre, il devrait être possible d'identifier chez le pommier des gènes homologues à ceux déjà découverts comme impliqués dans cette résistance chez d'autres espèces végétales. En 2010, Velasco *et al.* ont publié le séquençage du génome de la variété 'Golden Delicious' du pommier (*Malus x domestica* Borkh). A partir de cette séquence et de logiciels de prédiction de gènes, environ 60 000 gènes ont pu être prédits chez le pommier.

L'objectif de mon stage était d'identifier chez le pommier, à l'aide du séquençage de son génome, des gènes potentiellement impliqués dans la résistance basale et d'analyser leur expression chez trois génotypes de pommier : la variété partiellement résistante 'Fiesta' et la variété sensible 'Gala' (Trillot *et al.*, 2002 ; Laurens *et al.*, 2004 ; Brun *et al.*, 2008) et chez le porte-greffe 'MM106' considéré *a priori* comme sensible (communication personnelle C-E Durel), en condition d'infection ou non par la tavelure. Mon stage a tout d'abord consisté à 1) faire une recherche bibliographique approfondie pour répertorier les gènes connus comme impliqués dans la résistance basale chez les plantes face aux maladies bactériennes et fongiques ; puis à 2) rechercher sur le génome du pommier les meilleurs gènes candidats homologues à ceux trouvés ; et enfin à 3) analyser par la méthode de PCR quantitative (qPCR) l'expression de ces gènes candidats.

## **2. BIBLIOGRAPHIE**

Les plantes sont continuellement exposées à une multitude d'agents potentiellement pathogènes. Or contrairement aux animaux, les plantes n'ont pas de cellules immunitaires mobiles destinées à éliminer ces agents pathogènes. Elles ont donc évolué en développant d'autres mécanismes de reconnaissance et de défense face aux intrusions externes. Chaque cellule végétale d'une plante dispose d'un système immunitaire inné et l'émanation de signaux systémiques transmis à partir du lieu d'infection permet la généralisation des défenses à l'échelle de toute la plante (Jones et Dangl, 2006).

Les plantes sont les hôtes d'un grand nombre d'êtres vivants qui peuvent leur être néfastes. Il peut s'agir de virus, de bactéries, de champignons, d'insectes, de nématodes, ... On nomme agent pathogène un agent biologique responsable d'une maladie infectieuse. Les agents biotrophes sont des organismes qui puisent leur énergie des cellules vivantes de la plante contrairement aux agents nécrotrophes qui la prennent des cellules mortes. Les

## Bibliographie

---

organismes hémibiotrophes sont caractérisés par une période initiale biotrophe suivi d'une période nécrotrophe (pour revue : Oliver et Ipcho, 2004). Afin de faire face à ces différents agents pathogènes, les plantes ont mis en place plusieurs formes de résistance qui se traduisent par plusieurs phénotypes.

### 2.1. La résistance des plantes aux agents pathogènes

Les différents phénotypes de résistance ou de sensibilité de la plante sont abordés dans la première partie de cet exposé. Ils résultent de mécanismes moléculaires sous-jacents présentés dans une deuxième partie.

#### 2.1.1. Les différents phénotypes de résistances

##### 2.1.1.1. La résistance non-hôte

La résistance non-hôte est la forme de résistance la plus commune et la plus durable chez les plantes. Elle est efficace contre la majorité des micro-organismes potentiellement pathogènes et, en condition de résistance non-hôte, pour un couple « espèce végétale/agent pathogène » donné, tous les génotypes de l'espèce sont résistants à tous les isolats/souches de l'agent pathogène (pour revue : Mysore et Ryu, 2004). La résistance non-hôte peut donc être qualifiée de non spécifique. On distingue deux types de résistance non-hôte: le type I et le type II.

La résistance non-hôte de type I est la plus commune, elle se caractérise par une absence totale de symptômes (pour revue : Mysore et Ryu, 2004). Elle correspond à l'impossibilité pour l'agent pathogène de passer les barrières préformées de la plante (cuticule, métabolites secondaires, ...) ou à l'arrêt précoce de sa pénétration et de sa multiplication dans les tissus végétaux grâce aux réactions de défense inductibles. La résistance non-hôte de type II est quant à elle toujours associée à une réaction hypersensible (HR) réponse rapide et localisée, caractérisée par une mort cellulaire au site d'infection (pour revue : Mysore et Ryu, 2004).

##### 2.1.1.2. La résistance hôte

Dans le cas d'une résistance de type hôte, pour le couple espèce végétale/agent pathogène considéré, les souches de l'agent pathogène sont capables d'infecter tout ou partie des génotypes de l'espèce végétale (pour revue : Mysore et Ryu, 2004). Contrairement à la résistance non-hôte, la résistance hôte est donc spécifique : sur un génotype donné, son existence dépend de la souche de l'agent pathogène en présence (pour revue : Heath, 2000 ; Mysore et Ryu, 2004). On parle d'interaction incompatible entre l'agent pathogène et la plante lorsque le phénotype est caractérisé par une résistance complète, ou encore dite qualitative, qui se caractérise souvent par une HR (Greenberg et Yao, 2004). Une interaction compatible se traduit quant à elle par un phénotype de sensibilité ou de résistance partielle, encore dite quantitative. Le phénotype de sensibilité correspond à une absence de résistance efficace, qui se traduit par la présence de symptômes de maladie (Figure 3), tandis que la résistance partielle correspond à une situation où la progression de l'agent pathogène peut être

---

## Bibliographie

---

ralentie mais non stoppée. Le phénotype de la résistance partielle est également caractérisé par des symptômes de maladie.

### 2.1.2. Les mécanismes moléculaires de la résistance des plantes

#### 2.1.2.1. Les défenses préformées

Les défenses préformées correspondent au premier obstacle auquel les agents pathogènes sont confrontés. Elles sont de deux types : physiques et chimiques. Les barrières physiques sont principalement représentées par les parois cellulaires végétales mais on peut également citer le rôle du cytosquelette dans la réduction de l'invasion par l'agent pathogène, ou encore celui de la cuticule qui protège les parties aériennes de la plante (pour revue : Mysore et Ryu, 2004). Ces défenses préformées incluent également des défenses chimiques telles que les métabolites secondaires (phytoanticipine, saponine, ...) qui ont une action principalement antimicrobienne mais pas uniquement. Le végétal peut aussi les produire et les accumuler comme constituant de la croissance et du développement de la plante ou encore pour la rendre impropre à la consommation par les phytophages (pour revue : Heath, 2000 ; Mysore et Ryu, 2004). Aucun stimulus n'est nécessaire pour la mise en place des défenses préformées, elles sont actives de manière constitutive.

#### 2.1.2.2. Les défenses inductibles

Les défenses inductibles constituent le deuxième obstacle auquel font face les agents pathogènes lors de l'infection d'une plante. De manière schématique, aboutir au déclenchement des défenses inductibles nécessite trois étapes successives : une reconnaissance de la présence de l'agent pathogène par la plante, suivie d'une transduction du signal, qui aboutit à l'activation des gènes de défense. Un certain nombre de défenses inductibles sont impliquées à la fois dans l'expression de la résistance hôte et de la résistance non-hôte, suggérant qu'elles peuvent être élicitées par des signaux respectivement spécifiques ou non spécifiques. Ces signaux peuvent être produits par les agents pathogènes, ou peuvent résulter de la dégradation des cellules de l'hôte (Heath, 2000).

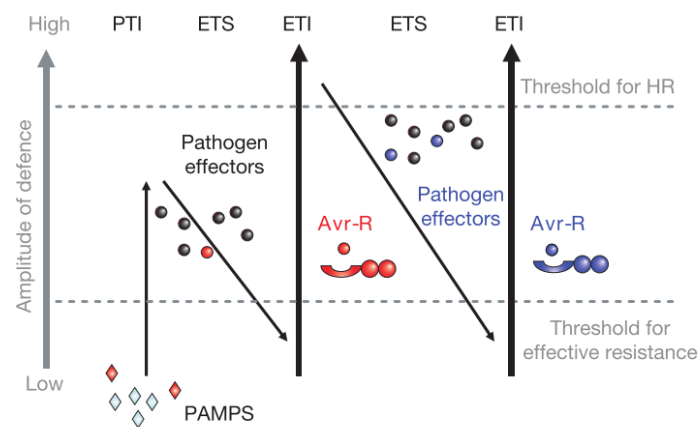
Jones et Dangl (2006) ont défini un modèle dit en « Zig-Zag » de cinq phases pour représenter le système immunitaire des plantes (Figure 4). Lorsque l'agent pathogène réussit à franchir les défenses préformées, les cellules végétales sont capables de détecter des molécules de surface des agents pathogènes, molécules appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern). Un PAMP est une molécule qui fonctionne pour la plante hôte comme une signature de la présence de tout agent pathogène d'une classe donnée. Il peut s'agir de composés tels que la flagelline du flagelle des bactéries, les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries GRAM -, ou encore la chitine, composant structural de la paroi des champignons (pour revue : Boller et Felix, 2009). La plante peut également percevoir une agression grâce à la reconnaissance de composés issus de la dégradation de ses propres constituants par l'agent pathogène, ces composés sont appelés DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) ou éliciteurs endogènes. Les PAMPs/DAMPs sont reconnus par l'hôte grâce aux récepteurs PRRs (PAMP Recognition Receptor) situés dans la membrane plasmique via un unique domaine transmembranaire (pour revue : Henry *et al.*, 2012). Cette



## Bibliographie

reconnaissance déclenche une résistance appelée PTI (PAMP-Triggered Immunity). Celle-ci peut retarder voire bloquer l'avancée de l'agent pathogène. Il s'agit de la phase 1 du modèle Zig-Zag. Au niveau de la phase 2 du modèle, les agents pathogènes n'ayant pas été arrêtés par l'étape précédente déploient des effecteurs à l'intérieur des cellules végétales qui vont alors bloquer la PTI, soit en interfèrent avec l'événement de reconnaissance, soit en intervenant au niveau de la transduction du signal. Il en résulte une sensibilité accrue du végétal appelée ETS (Effector-Triggered Susceptibility). La phase 3 du modèle correspond à la reconnaissance spécifique d'effecteurs de l'agent pathogène par des récepteurs de la plante, codés notamment par les gènes dit gènes de résistance (gènes R). On parle alors d'ETI (Effector-Triggered Immunity). L'ETI comprend la résistance dite gène-pour-gène. Cette dernière est un modèle développé antérieurement au concept d'ETI. Il explique que si à un effecteur donné de l'agent pathogène, alors dit facteur d'avirulence, correspond un gène R de reconnaissance chez l'hôte, alors l'agent pathogène sera avirulent et la plante présentera une résistance totale. Si par contre l'hôte ne possède pas de gène R permettant de reconnaître l'effecteur, alors dit facteur de virulence, l'agent pathogène sera virulent et la plante sensible (Flor, 1971). Les phases 4 et 5 du modèle en « Zig-Zag » représentent la co-évolution entre la plante et l'agent pathogène qui conduit à l'évolution des effecteurs avirulents pour contourner l'ETI, à l'origine d'une nouvelle phase de sensibilité du végétal (ETS), puis à l'évolution des récepteurs codés par les gènes R pour reconnaître ces nouveaux facteurs de virulence.

Pour encore améliorer ce modèle, Jones et Dangl (2006) définissent la résistance basale comme étant la résistance activée par un agent pathogène virulent sur un hôte sensible. Elle correspond donc à la PTI sans les effets de l'ETS et avec une ETI faible.



**Figure 4.** Modèle en « Zig-Zag » d'après Jones et Dangl (2006). En phase 1, les plantes détectent les PAMPs (en rouge) via les récepteurs PRRs pour déclencher la PTI. En phase 2, les agents pathogènes libèrent des effecteurs qui répriment la PTI, ce qui permet la nutrition et la multiplication des agents pathogènes à l'origine de l'état de sensibilité ETS. En phase 3, un effecteur (en rouge) est reconnu par un récepteur codé par un gène R, ce qui active l'ETI. En phase 4, l'évolution des agents pathogènes permet la mutation de leurs facteurs d'avirulence, qui deviennent donc des facteurs de virulence (en bleu). Ceux-ci ne sont, par conséquent, plus reconnus, permettant à l'agent pathogène de supprimer l'ETI et de déclencher une nouvelle ETS. En phase 5, l'évolution de la plante permet la création de nouveaux gènes R capables de reconnaître les nouveaux facteurs de virulence, qui redeviennent alors des facteurs d'avirulence, permettant ainsi à nouveau une ETI.

# Bibliographie

## 2.1.3. Relation phénotype/ mécanismes moléculaires

La résistance non-hôte est principalement causée par les défenses préformées (Health, 2000). Cependant, il est aussi admis que la résistance non-hôte peut impliquer des défenses induites à travers une résistance basale ou une résistance gène-pour-gène (Tableau 1 ; Jones et Dangl, 2006). Il en résulte le déclenchement des défenses de la plante et plus précisément une HR (pour revue : Mysore *et al.*, 2004 ; Uma *et al.*, 2011).

La résistance hôte peut quant à elle impliquer tous les types de défenses. Ainsi, la résistance complète, issue d'une interaction incompatible, est le résultat de la somme des défenses préformées, des défenses basales et des défenses issues de la résistance gène-pour-gène, avec un rôle central pour ces dernières (Tableau 1 ; Vergne, 2007). Ce type de résistance est à l'origine de l'absence de développement de maladies. Par ailleurs, en situation d'interaction compatible, la résistance partielle est également le résultat de la somme des défenses préformées, des défenses basales et des défenses issues de la résistance gène-pour-gène, mais avec un manque d'efficacité de ces dernières (Tableau 1 ; Vergne, 2007). Les gènes R ont alors une capacité réduite de reconnaissance des facteurs d'avirulence aboutissant à une faible activation des défenses. La résistance partielle entraîne tout de même une réduction de l'infection par l'agent pathogène. Enfin, dans le cas d'une sensibilité, la résistance gène-pour-gène est inexistante ou déficiente et les défenses préformées et basales ne permettent pas à elles seules un phénotype de résistance (Tableau 1 ; Vergne, 2007). L'infection a alors lieu sans dommage pour l'agent pathogène.

**Tableau 1.** Interaction entre définitions phénotypique et fonctionnelle de la résistance. +++ désigne une implication forte des défenses, ++ définit une implication moyenne et + une implication faible (d'après Vergne, 2007).

		Définitions fonctionnelles				
		Défenses préformées	Défenses basales	Défenses gène-pour-gène		
Définitions phénotypiques	Résistance non-hôte	Type I		+++		
		Type II		+++ ou ++ ou +	+++ ou ++ ou +	+++
	Résistance hôte	Interaction incompatible	Résistance complète	+++ ou ++ ou +	+++ ou ++ ou +	+++
			Résistance partielle	+++ ou ++ ou +	+++ ou ++	+
		Interaction compatible	Sensibilité	++ ou +	++ ou +	Absence

## 2.2. Les mécanismes de défense de la PTI

### 2.2.1. De la reconnaissance de l'agent pathogène aux réactions de défense

#### 2.2.1.1. La reconnaissance du pathogène par la plante

Les PAMPs/DAMPs sont reconnus par l'hôte grâce aux récepteurs PRRs situés dans la membrane plasmique via un unique domaine transmembranaire (pour revue : Henry *et al.*,

## Bibliographie

---

2012). Ce sont des récepteurs qui ont le plus souvent un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR, Leucine Rich Repeat) ou en lysine (LysM, Lysine Motif) pour fixer l'épitope du PAMP/DAMP. Par ailleurs, leur éventuel domaine intracellulaire, nécessaire pour véhiculer le signal reconnu à l'ensemble de la cellule, peut être un domaine sérine/thréonine kinase, et on parlera alors de récepteur RLK (Receptor Like Kinase), ou un domaine sans activité kinase et l'on parlera alors de récepteur RLP (Receptor Like Protein) (pour revue : Henry *et al.*, 2012). Pour exemple, le récepteur FLS2 (Flagellin Sensitive 2) qui reconnaît l'épitope flg22, du PAMP flagelline est un LRR-RLK, soit un récepteur à domaine extracellulaire riche en leucine et au domaine intracellulaire de type kinase. Les récepteurs PRRs sont une composante clé du système immunitaire des plantes. La stratégie est en effet de pouvoir reconnaître, avec un petit nombre de PRRs, un large spectre d'agents pathogènes (pour revue : Antolin-Llovera *et al.*, 2012).

### 2.2.1.2. La transduction du signal

L'activation de récepteurs PRRs par reconnaissance de PAMPs/DAMPs, induit une signalisation en cascade aboutissant à l'activation des défenses. Celle-ci repose sur l'activation de protéines appelées MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase). La signalisation repose sur la phosphorylation et l'activation d'une MAPK par une MAPK kinase (MAPKK). Cette dernière ayant elle-même été phosphorylée et activée par une MAPKK kinases (MAPKKK). Les MAPKs appartiennent à une classe spécifique de protéine sérine/thréonine kinases et jouent un rôle central dans la transduction de signaux intra- et extracellulaires en modulant l'activité d'autres protéines. Il s'agit d'une famille multigénique particulièrement conservée chez les Eucaryotes (pour revue : Mishra *et al.*, 2006). En effet, les humains, les levures et les plantes ont en commun près de 60% de leurs gènes, dont ceux impliqués dans le processus de signalisation via les kinases (pour revue : Nakagami, 2005). La voie des MAPKs est impliquée dans la transduction de signaux cellulaires pour de nombreux processus biologiques incluant la division et la différenciation cellulaire, la réponse aux stress abiotiques et biotiques dont l'induction des voies de signalisation acide jasmonique-, acide salicylique- ou encore éthylène-dépendante. Concernant la réponse aux stress biotiques, ces molécules cytoplasmiques sont souvent activées aussi bien dans la résistance basale que dans la résistance gène-pour-gène. Mishra *et al.* (2006) détaillent plusieurs exemples impliquant des MAPKs. Les MAPKs ont un rôle dans le déclenchement des réactions de défense en modulant l'expression des facteurs de transcription de type WRKY. Ces derniers vont ensuite induire ou réprimer l'expression de gènes de défense.

Les facteurs de transcription WRKY sont définis par la présence de plusieurs séquences d'acides aminés WRKY près de leur extrémité N terminale, qui peuvent se lier à la « W box » (séquence TTGACC/T) des promoteurs de certains gènes de défense (Eulgem et Somssich, 2007). Tout comme les MAPKs, les facteurs de transcription WRKY interviennent dans différents processus biologiques tels que la réponse aux stress biotiques, qu'il s'agisse d'une PTI ou d'une ETI, la réponse aux stress abiotiques, des processus physiologiques tels que la germination, ou encore la sénescence (Rushton *et al.*, 2010).



## Bibliographie

---

### 2.2.1.3. Les défenses déclenchées par les PAMPs/DAMPs

La perception des PAMPs/DAMPs par les récepteurs PRRs de la plante entraîne une série de réponses (Yamaguchi et Hufferker, 2011 ; Zhang *et al.*, 2013). Tout d'abord, une alcalinisation du milieu de croissance de l'agent pathogène via des flux d'ions H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et Ca<sup>2+</sup> représente une première réponse physiologique pour perturber son développement. Puis, une production rapide et transitoire de ROS (Reactive Oxygen Species) est déclenchée durant un burst oxydatif (Faulkner et Robatzek, 2012). Ce burst, et notamment la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), est d'ailleurs recherchée comme indicateur du déclenchement de la PTI (Shimizu *et al.*, 2010). Les ROS deviennent alors des molécules signal pour la plante et participeront notamment au renforcement pariétal (Faulkner et Robatzek, 2012). Enfin, les réactions de défense se traduisent par une accumulation de callose synthétisée entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique (Faulkner et Robatzek, 2012), et parfois par la fermeture des stomates (Pitzscke *et al.*, 2009 ; Faulkner et Robatzek, 2012) pour bloquer l'intrusion de l'agent pathogène. L'induction de gène de défenses participant aussi à l'ETI est également rapportée lors d'une PTI (pour revue : Thomma *et al.*, 2011).

### 2.2.2. Les PRRs et la voie de transduction du signal associé

#### 2.2.2.1. Les PRRs et leurs corécepteurs chez les plantes

##### 2.2.2.1.1. Les PRRs identifiés dans la reconnaissance des bactéries

###### 2.2.2.1.1.1. Les LRR-RLK

Trois PRRs de la famille des LRR-RLK, ont été identifiés comme récepteurs de PAMPs bactériens. Le couple PAMP/PRR le plus connu est flg22/FLS2. La flagelline est un composant du flagelle bactérien et l'épitope flg22, un peptide de 22 acides aminés constitutif de cette flagelline, est reconnu par le récepteur FLS2 (Flagellin-Sensing 2) de la membrane plasmique végétale. L'implication de ce couple dans la PTI a d'abord été découverte chez *Arabidopsis thaliana* (pour revue : Gomez-Gomez et Boller, 2002). Takai *et al.* (2008) ont quant à eux identifié OsFLS2, l'orthologue d'AtFLS2 chez le riz à partir de cultures cellulaires, et ont validé sa fonction dans la perception de flg22 et le déclenchement de réactions de défense face à *Acidovorax avena*. Des orthologues fonctionnels d'AtFLS2 ont également été trouvés chez *Nicotiana benthamiana* et *Lycopersicon peruvianum* (pour revue : Zipfel, 2009) et des gènes homologues ont été identifiés chez *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Ricinus communis* et *Zea mays* (pour revue : Boller et Felix, 2009). Le récepteur FLS2 a donc été détecté chez plusieurs familles végétales. La perte du système de reconnaissance de la flagelline chez *A. thaliana* et *N. benthamiana* entraîne une sensibilité aux souches virulentes et avirulentes de *Pseudomonas syringae* (pour revues : Boller et Felix, 2009 ; Zipfel, 2009).

Une autre molécule particulièrement abondante et bien conservée chez les bactéries (plus de 90% de similarité de séquence entre différentes bactéries ; Kunze *et al.*, 2004) est le facteur d'élongation EF-Tu, impliqué dans la synthèse protéique. Il est perçu comme un PAMP par le récepteur LRR-RLK EFR. Ce récepteur de structure très proche de FLS2 (pour revue : Boller et Felix, 2009), fixe l'épitope elf18 (les 18 acides aminés en position N-

## Bibliographie

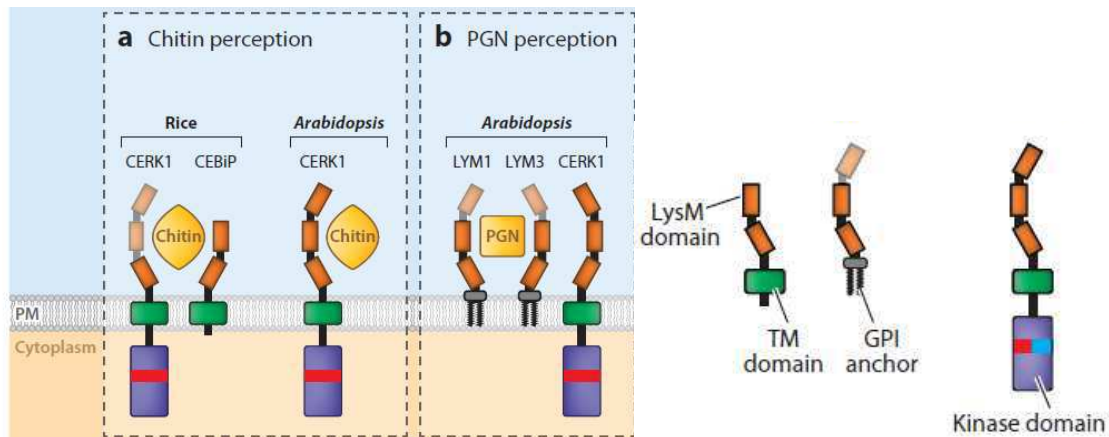
---

terminale) de EF-Tu. Kunze *et al.* (2004) ont montré que seules les cellules foliaires des Brassicacées pouvaient percevoir elf18 et déclencher des réactions de défense. Ils n'ont, en effet, trouvé aucune réponse à des traitements avec des peptides d'EF-Tu chez plusieurs autres espèces dont *Solanum tuberosum*, *Cucumis sativus*, *Helianthus annuus*, ou encore *Glycine max*, bien que ces espèces répondent au traitement par flg22. Toutefois, des homologues d'EFR semblent exister chez le riz et le peuplier pouvant suggérer la présence de PRRs encore non identifiés chez ces espèces (pour revue : Boller et Felix, 2009).

Le récepteur LRR-RLK XA21, qui confère la résistance à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* chez le riz, reconnaît le facteur d'avirulence Ax21, un peptide sulfaté de 17 acides aminés probablement impliqué dans la détection du quorum (pour revue : Segonzac et Zipfel, 2011). La haute conservation de Ax21 chez l'ensemble des *Xanthomonas* accrédite la fonction de XA21 comme PRR chez le riz (pour revues : Boller et Felix, 2009 ; Segonzac et Zipfel, 2011). La présence de ce récepteur dans d'autres espèces végétales n'a pas été encore démontrée à ma connaissance. Néanmoins Danna *et al.* (2011) ont montré que chez *A. thaliana* axY<sup>s</sup>22 (un dérivé non sulfaté d'Ax21) est perçu par FLS2. Cependant, il n'est pas encore démontré si AtFLS2 est l'unique récepteur de ce PAMP ou s'il existe un homologue de XA21.

### 2.2.2.1.1.2. Les LysM-RLP et LysM-RLK

Les récepteurs LysM-RLP et LysM-RLK sont quant à eux capables d'induire des réactions de défense chez la plante suite à la reconnaissance de peptidoglycanes (PGN) (pour revue : Antolin-Llovera *et al.*, 2012). Ces derniers sont des oligomères de N-acetylglucosamine et d'acide N-acetylmuramique, constitutifs de la membrane externe des bactéries GRAM+ et GRAM-, qui assurent la rigidité de l'enveloppe bactérienne (Willmann *et al.*, 2011). Willmann *et al.* (2011) ont démontré l'implication d'un système complexe de trois molécules membranaires, CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase1), LYM1 et LYM3, dans la reconnaissance de ces PGNs et dans l'activation de la PTI chez *A. thaliana*. LYM1 et LYM3 sont deux récepteurs membranaires LysM-RLP capables de lier des PGNs de différentes origines bactériennes mais incapables de transmettre le signal de la reconnaissance car ne possédant pas de domaine cytoplasmique. Ce rôle de transduction du signal serait tenu par le LysM-RLK CERK1, via son domaine kinase cytoplasmique et qui est lui incapable de fixer directement les PGNs sans que la raison en ait été découverte à ma connaissance (Figure 5.B). Les preuves expérimentales d'interactions entre ces trois récepteurs manquent toujours à ce jour (Willmann *et al.*, 2011 ; Antolin-Llovera *et al.*, 2012). CERK1 était auparavant uniquement connu pour son rôle de PRR dans la reconnaissance de la chitine des champignons, ce qui est traité dans la partie suivante.



**Figure 5.** Implication de récepteurs LysM-RLP et LysM-RLK dans la perception de PAMPs. a) Perception de la chitine chez le riz et *A. thaliana* par CERK1 et/ou CEBiP. b) Perception des PGN par le complexe LYM1-LYM3-CERK1 chez *A. thaliana*. TM domain : domaine transmembranaire, GPI anchor : fixation glycosylphosphatidylinositol (d'après Antolin-Llovera *et al.*, 2012).

## 2.2.2.1.2. Les PRRs identifiés dans la reconnaissance des champignons

La chitine est un oligosaccharide universellement présent dans les parois des cellules fongiques, dont elle assure la rigidité et la protection vis-à-vis de l'environnement. Ce composé structural est issu de la polymérisation de N-acétylglucosamine, oligosaccharide que l'on retrouve également dans la composition des PGNs (Antolin-Llovera *et al.*, 2012). Chez *A. thaliana*, la reconnaissance de N-acétylglucosamine est faite par le LysM-RLK CERK1, précédemment décrit dans la reconnaissance des PGNs. Ce récepteur semble suffire à lui seul pour déclencher les réactions de défenses chez cette espèce (Shinya *et al.*, 2012). L'orthologue OsCERK1 d'AtCERK1 a été identifié chez le riz où il fonctionne en synergie avec un autre LysM-RLP nommé OsCEBiP (Chitin Elicitor-Binding Protein). OsCEBiP est une glycoprotéine transmembranaire qui reconnaît les molécules de N-acétylglucosamine via les deux motifs LysM de son domaine extracellulaire. OsCEBiP ne possédant pas de domaine intracellulaire, il ne peut transmettre le signal de reconnaissance. Chez le riz, OsCERK1 et OsCEBiP s'associent donc pour former un récepteur multi-composants capable de transmettre le signal de reconnaissance et ainsi générer des réactions de défenses (Figure 6.A ; Shimizu *et al.*, 2010 ; Antolin-Llovera *et al.*, 2012). L'existence de protéines à forte affinité de liaison pour les oligosaccharides constitutifs de la chitine a été démontrée chez le soja, le blé, l'orge et la carotte, par l'obtention de réponses similaires à celles engendrées par OsCEBiP chez le riz (Okada *et al.*, 2002 ; Kaku *et al.*, 2006).

Les  $\beta$ -glucanes sont des composants caractéristiques des parois cellulaires des champignons phytopathogènes et des oomycètes et ils servent de PAMPs pour leurs hôtes végétaux (pour revues : Bittel et Robatzek, 2007 ; Silipo *et al.*, 2010). Ces fragments pariétaux sont libérés au lieu d'infection suite à l'action de  $\beta$ -glucanases émises par la plante pour se défendre ou par le champignon lui-même dans le cas, par exemple, de la germination des spores (pour revue : Silipo *et al.*, 2010). Plusieurs  $\beta$ -glucanes poly- et oligosaccharides ont été identifiés comme éliciteurs des défenses des plantes chez un large spectre d'espèces végétales (pour revue : Silipo *et al.*, 2010 ; Thomma *et al.*, 2011). Cependant, chaque espèce végétale semble reconnaître spécifiquement les  $\beta$ -glucanes d'une structure donnée. Le  $\beta$ -

## Bibliographie

---

glucane linéaire appelé laminarine et initialement découvert chez l'algue *Laminaria digitata*, est quant à lui bien connu pour déclencher des réactions de défense chez plusieurs espèces végétales (Aziz *et al.*, 2003 ; pour revue : Silipo *et al.*, 2010). Il est d'ailleurs utilisé en agriculture biologique sur pommier contre la tavelure [6]. Une protéine végétale soluble, purifiée chez le soja et identifiée dans la matrice extracellulaire, appelée GBP ( $\beta$ -Glucan-Binding Protein), a été caractérisée comme récepteur potentiel des hepta- $\beta$ -glucosides des oomycètes *Phytophthora sojae* et *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* (Umemoto *et al.*, 1997 ; Fliegmann *et al.*, 2004). GBP est caractérisée par une activité 1,3- $\beta$ -glucanase qui permet de générer des fragments de  $\beta$ -glucane, qui deviennent alors des ligands pour son site de liaison à forte affinité des  $\beta$ -glucanes (Fliegmann *et al.*, 2004 ; pour revues : Zipfel, 2009 ; Silipo *et al.*, 2010). Des gènes homologues à GBP ont été trouvés chez beaucoup d'espèces mais l'activité de GBP n'a été détectée, à ce jour, que chez les Fabacées (Fliegmann *et al.*, 2004 ; pour revue : Schwessinger *et al.*, 2012 ; Monaghan et Zipfel, 2012). Fliegmann *et al.* (2004) ont mis en avant que les 40% de différence de séquence entre les gènes codant pour GBP chez les Fabacées ou les autres familles peuvent être à l'origine du manque d'affinité de cette protéine pour les  $\beta$ -glucanes chez ces autres familles. Plusieurs auteurs font l'hypothèse que GBP doit faire partie d'un complexe protéique membranaire, dans lequel elle est essentielle mais pas suffisante pour permettre le déclenchement des réactions de défense (Zipfel, 2009; Monaghan et Zipfel, 2012). Les interactions membranaires au sein du complexe et les mécanismes sous-jacents à la reconnaissance des  $\beta$ -glucanes par GBP ne sont pas encore connus.

Enfin, LeEIX1 et LeEIX2 sont des récepteurs transmembranaires de types LRR-RLP détectés uniquement chez *Nicotiana tabacum* et *Solanum lycopersicum* et impliqués dans l'activation des défenses par liaison de la xylanase EIX (Ethylene-Inducing Xylanase) de l'ascomycète saprophyte *Trichoderma viride* (pour revue : Boller et Felix, 2009). Cette xylanase est une enzyme libérée par le champignon, qui lui permet de digérer le xylane, un composé de la paroi des cellules végétales.

### 2.2.2.1.3. Les PRRs identifiés dans la reconnaissance des DAMPs

PEPR1 (PEP Receptor 1) et PEPR2 (PEP Receptor 2) sont deux récepteurs LRR-RLK identifiés chez des cultures cellulaires d'*A. thaliana* et sensibles à AtPep (pour revue : Ryan *et al.*, 2007). Ce peptide de 23 acides aminés est dérivé de la partie C-terminale de PROPEP (Elicitor Peptide Precursor), une protéine cytoplasmique encodée par le gène *PROPEP* induit par des blessures, le méthyljasmonate, l'éthylène ou encore flg22 et AtPep1 (pour revue : Boller et Felix, 2009). Krol *et al.* (2010) ont montré chez *A. thaliana*, via l'analyse d'un double mutant *pepr1/pepr2* complètement insensible à AtPep1, que PEPR1 et PEPR2 fixaient tous deux ce ligand et donc qu'ils fonctionnaient en synergie. Yamaguchi *et al.* (2010) ont quant à eux démontré que PEPR1 était le récepteur primaire d'AtPep1 chez *A. thaliana*. PEPR1 et PEPR2 sont également sensibles à cinq homologues d'AtPep1, nommés AtPep2 à 6 (Krol *et al.*, 2010). Enfin, un traitement avec flg22 augmente l'induction du gène codant PROPEP et des deux récepteurs PEPR1 et 2, tandis qu'un traitement avec AtPep1 induit la transcription de FLS2 (pour revue : Ryan *et al.*, 2007). Le modèle proposé est donc qu'une reconnaissance de PAMPs par des PRRs (FLS2, EFR) induit l'expression du gène codant

## Bibliographie

---

PROPEP et des gènes de PEPR1 et PEPR2. A partir de PROPEP il se forme des AtPep1 qui vont être à leur tour reconnus par les récepteurs PEPR1 et 2. Ainsi, il semblerait que PEPR1 et PEPR2 aient davantage un rôle d'amplificateur de réponses après la reconnaissance de PAMPs par d'autres PRRs qu'un rôle de PRR à proprement dit, impliqué dans la perception des DAMPs (pour revue : Ryan *et al.*, 2007). Ces deux récepteurs LRR-RLK sont tout de même considérés par certains chercheurs comme des PRRs au vu de leur nature et des réactions de défense qu'ils engendrent (production de ROS, flux d'ions, production d'éthylène, ...) même si elles sont de plus faibles amplitudes que celles causées par FLS2 ou EFR (Krol *et al.*, 2010 ; Yamaguchi *et al.*, 2010). Yamaguchi et Huffaker (2011) émettent l'hypothèse d'un rôle d'inducteur de défense probablement conservé des peptides « Pep » chez les plantes supérieures au vu de la détection chez plusieurs espèces végétales de séquence similaire à AtPep1.

Les oligogalacturonides (OGs) sont le produit de la dégradation de la matrice extracellulaire végétale par des CWDEs (Cell Wall Degrading Enzymes) dont les plus étudiées sont les endopolygalacturonases (PGs). Ces enzymes sont importantes pour les champignons nécrotrophes ou n'ayant pas de structure spécialisée pour la pénétration des tissus végétaux. Les PGs clivent les liaisons entre les  $\alpha$ 1,4-D-acide galacturonique de l'homogalacturonane, le composant majeur de la pectine, libérant ainsi des fragments d'OG (pour revue : Lotze *et al.*, 2007). Ces derniers jouent alors le rôle d'éliciteurs endogènes permettant de communiquer les dommages subis par les cellules aux tissus avoisinant ou à l'ensemble de la plante. Ils sont reconnus comme un DAMP par le récepteur EGF-RLK (Epidermal Growth Factor - Receptor like Kinase) WAK1 (Wall Associated Kinase) (pour revue : Henry *et al.*, 2012). WAK1 fait partie d'une vaste famille, les WAKs, qui chez les angiospermes font le lien physique entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire (pour revue : Anderson *et al.*, 2001). La fonction de AtWAK1 en tant que PRR a été identifiée par Brutus *et al.* (2010) qui, avec l'utilisation de récepteurs chimériques combinant les domaines extra- et intracellulaire de AtWAK1 et d'autres PRRs, ont montré d'une part que le domaine extracellulaire de AtWAK1 percevait bien les fragments d'OG et d'autre part que le domaine cytoplasmique kinase de WAK1 induisait bien une réaction de défense. Cependant, c'est la seule WAK connue pour être sur-exprimée en réponse aux fragments d'OG. Elle est par ailleurs sous-exprimée en présence de flg22, comme WAK2 (Denoux *et al.*, 2008). Enfin, les fragments d'OG ne seraient pas seulement impliqués dans les réactions de défense mais joueraient également un rôle durant la croissance et le développement du végétal, de manière antagoniste à l'auxine (Brutus *et al.*, 2010 ; Schwessinger et Ronald, 2012).

### 2.2.2.1.4. Le co-récepteur BAK1

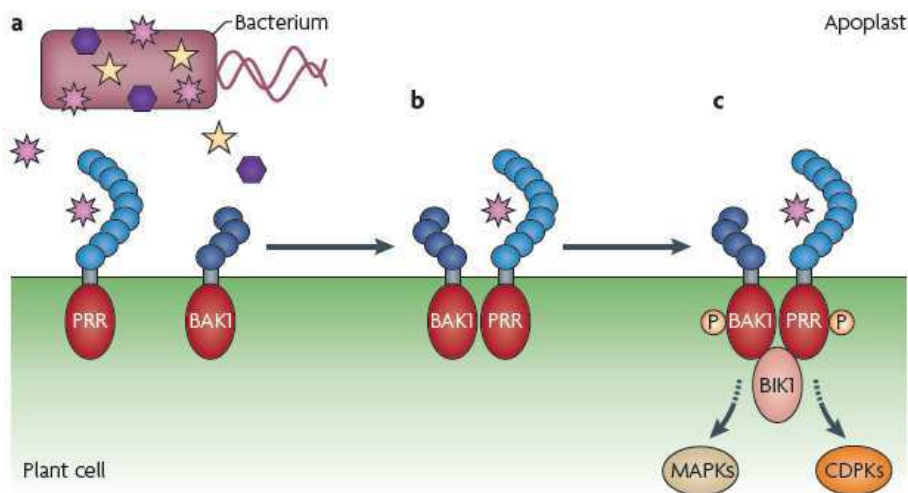
La plupart des PRRs connus requièrent pour fonctionner le co-récepteur LRR-RLK BAK1 (Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Kinase 1). BAK1 fait partie de la famille des SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), une famille de récepteurs impliqués dans les processus de développement et de réponses aux stress biotiques et abiotiques suite à la perception de brassinostéroïdes (pour revue : Chinchilla *et al.*, 2009). Roux *et al.* (2011) ont démontré le rôle central de BAK1 dans le déclenchement des défenses chez *A. thaliana* et *N. benthamiana* suite à la reconnaissance de flg22, elf18 et AtPep1 par les récepteurs FLS2, EFR



## Bibliographie

et PEPR1/2, respectivement. En 2010, Bar *et al.* ont mis en évidence l'interaction de BAK1 avec LeEIX2 dans l'atténuation des réponses de défense suite à la perception de EIX chez le tabac et la tomate. Ces résultats montrent que BAK1 n'est pas seulement impliqué dans les défenses dépendantes de la voie des brassinostéroïdes mais aussi dans celles dépendantes de la reconnaissance des PAMPs. BAK1 est la seule protéine de la famille des SERK identifiée comme ayant un rôle dans la résistance basale (pour revue : Dodds et Rathjen, 2010).

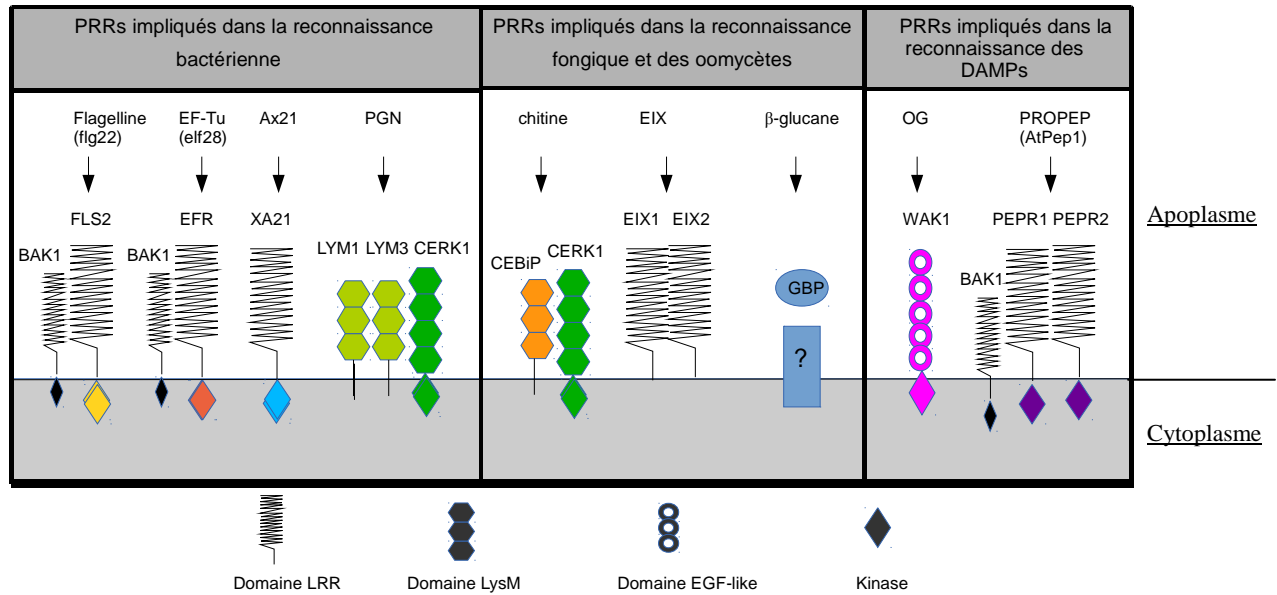
Un régulateur potentiel de l'interaction entre BAK1 et les autres LRR-RLK pourrait être BIK1 (Botrytis Induced Kinase 1), une kinase cytoplasmique identifiée dans des feuilles d'*A. thaliana* après infection par des agents pathogènes ou après traitements par des éliciteurs (pour revue : Dodds et Rathjen, 2010). Les interactions entre le PRR, BAK1 et BIK1 ne sont pas clairement définies à ce jour. Un modèle a été proposé pour les expliquer (Figure 6) : FLS2 (ou le PRR en général) et BAK1 ne seraient pas constitutivement associés. La stimulation de FLS2 par un PAMP entraînerait un changement de conformation de son domaine extracellulaire, ce qui induirait la phosphorylation de BAK1, permettant alors la formation du complexe protéique avec BIK1 à l'origine de la transduction du signal aux gènes de défense (pour revues : Boller et Felix, 2009; Dodds et Rathjen, 2010 ; Yang *et al.*, 2012). La transduction du signal qui suivrait se ferait soit directement via BIK1 soit par des MAPKs ou des CDPK (Calcium-Dependant Protein Kinase) (pour revue : Dodds et Rathjen, 2010 ; Yang *et al.*, 2012).



**Figure 6.** Interaction de BAK1 avec les PRRs pour former un complexe impliqué dans la réponse des plantes suite à la perception des PAMPs (Dodds et Rathjen, 2010). a) L'agent pathogène est reconnu par les PRRs de la plante via ses PAMPs. b) Immédiatement après la liaison du PRR et du PAMP, le PRR forme un complexe actif avec BAK1. c) Il en résulte une transphosphorylation (indiquée par P) des domaines kinase du PRR et de BAK1. La transduction du signal s'effectue alors soit directement via BIK1, soit via les MAPKs ou les CDPKs. Il s'agit d'un modèle généralisé qui est basé sur la perception de flg22 par FLS2.

Les couples PRRs et co-récepteurs / PAMPs ou DAMPs connus à ce jour sont présentés dans la figure 7 ci-dessous.

## Bibliographie



**Figure 7.** Les récepteurs PRRs connus chez les plantes et les PAMPs/DAMPs associés. Récepteurs FLS2, EFR, XA21, LYM1, LYM3, CERK1, CEBiP, EIX1, EIX2, GBP, WAK1, PEPR1 et PEPR2. Co-récepteur BAK1. PAMPs Flagelline (peptide flg22), EF-Tu (peptide elf28), Ax21, PGN, chitine, xylanase EIX, β-glucane. DAMPs OG, PROPEP (AtPep1). Dans le cas de GBP il est émis l'hypothèse qu'il fonctionnerait à travers un complexe de récepteurs inconnus à ce jour.

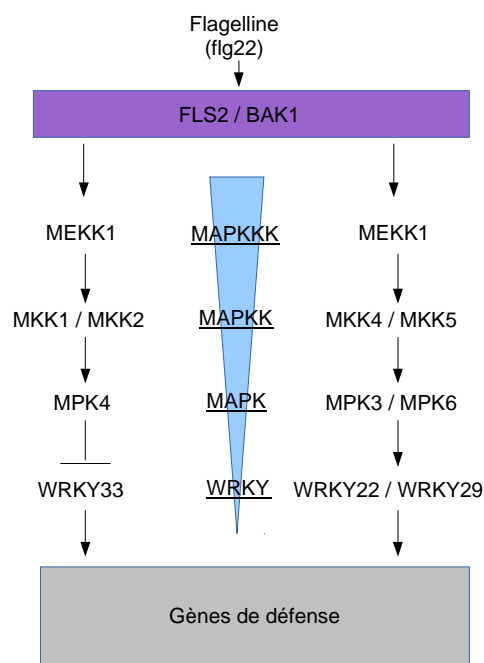
### 2.2.2.2. Les MAPKs et les WRKYs dans la transduction du signal lors d'une PTI

Suite à la perception de flg22 par FLS2 chez *A. thaliana*, Asai *et al.*, (2002) ont identifié une cascade MAPKs à l'origine de l'activation des gènes de défense. Une MAPKKK nommée MEKK1, deux MAPKKs, MKK4 et MKK5 et deux MAPKs, MPK3 et MPK6 ont été reconnues comme impliquées dans cette cascade (Figure 8). Ainsi Asai *et al.* (2002) ont montré que la reconnaissance de flg22 par FLS2, entraînait la phosphorylation de MEKK1, elle-même phosphorylant MKK4 et MKK5, phosphorylant à leur tour MPK3 et MPK6. MKK4 et MKK5 ainsi que MPK3 et MPK6 seraient également impliquées dans la transduction du signal via le récepteur EFR ou encore suite à une infection par *Botrytis cinerea* ce qui déclenche la production de la phytoalexine camalexine (pour revue : Pitzschke *et al.*, 2009). MPK3 et MPK6 seraient impliquées dans la PTI quelque soit le PAMP ou le DAMP considéré. Cependant elles peuvent également être des régulateurs clés dans les stress abiotiques et le développement des stomates (pour revue : Pitzschke *et al.*, 2009). Une seconde cascade MAPK est décrite dans la littérature comme impliquée dans la PTI chez *A. thaliana*. Suite à la reconnaissance de flg22, MEKK1 est phosphorylée, ce qui entrainerait la phosphorylation de MKK1/2, elles-mêmes phosphorylant MPK4 (Gao *et al.*, 2008 ; pour revue : Yang *et al.*, 2012).

Asai *et al.* (2004) ont également montré que WRKY 22 et WRKY 29 étaient activés par MPK3 et MPK6. De plus, Navarro *et al.* (2004) ont mis en évidence que neufs WRKYs étaient exprimés chez des plantules d'*A. thaliana* après 30 minutes d'exposition à un traitement de flg22 : WRKY22, -29, -33, -53, -28, -11, -15, -6, -7. A l'inverse, WRKY11 et WRKY17, ont été associés à une régulation négative de la résistance basale chez *A. thaliana* face à *Pseudomonas syringae* DC3000 (Journot-Catalino *et al.*, 2006 ; pour revue : Eulgem et Somssich, 2007). Enfin, Gao *et al.* (2008), ont montré que MPK4 réprimait WRKY33, et

## Matériel et Méthodes

Zheng *et al.* (2006) ont montré qu'une mutation d'AtWRKY33 rendait *A. thaliana* sensible à *Botrytis cinerea* et à *Alternaria brassicicola*. MPK4 et WRK33 formeraient un complexe, dissocié par la transduction du signal par les MAPKs MEKK1-MKK1/2 après perception d'un PAMP (pour revue : Rushton *et al.*, 2010 ; Figure 8).



**Figure 8.** Induction des gènes de défense par l'activation de la cascade MAPK déclenchée par la reconnaissance de flg22 par FLS2.

### **3. MATERIEL ET METHODES**

#### 3.1. Bioanalyses

##### 3.1.1. Recherche de gènes homologues

Un tblastx a été réalisé entre la séquence traduite de chaque gène récepteur et de signalisation sélectionné grâce à l'analyse bibliographique et la séquence traduite du génome du pommier. Ces alignements ont été réalisés en ligne sur le GDR® (Genom Database for Rosaceae ; <http://www.rosaceae.org/>) qui héberge la séquence du génome de *Malus x domestica* var. 'Golden Delicious', à partir des séquences des gènes sélectionnés disponibles chez *A. thaliana* et hébergées en ligne sur TAIR (The Arabidopsis Information Resource ; <http://www.arabidopsis.org/>). Les caractéristiques des gènes prédits du pommier issues de ces alignements de séquence ont été obtenues à partir du GDR® et de la base de données interne Malus V1.0. Il existe deux sources permettant d'accréditer l'existence des gènes prédits *in planta* : l'existence d'EST (Expressed Sequence Tag) ou de transcrits obtenus par « RNAseq ». Les EST trouvées, issues d'ARN produits dans diverses conditions, ont été obtenues à partir d'un alignement de la séquence nucléotidique des gènes prédits sur les séquences nucléotidiques contenues dans la banque d'EST du GDR®. Les transcrits obtenus par RNAseq sont disponibles au sein de la base de données interne au laboratoire.



---

## Matériel et Méthodes

---

### 3.1.2. Dessin des amorces

Les gènes candidats testés dans ce travail n'ont encore jamais été amplifiés chez le pommier. Il est donc nécessaire de dessiner pour chacun un couple d'amorces « Forward » (« sens », s'hybride sur le brin antisens du gène) / « Reverse » (« inverse », s'hybride sur le brin sens du gène) qui lui est spécifique. Ces amorces ont été dessinées manuellement ou à l'aide d'un logiciel dédié disponible en ligne : Primer3Plus® (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Les paramètres appliqués ont été les suivants : 20 paires de bases (pdb), 50% de bases G-C, terminaison 3' avec G ou C, température d'hybridation comprise entre 58 et 62°C et amplicon de 150 à 200 pdb. La température maximale d'hybridation est obtenue via la formule  $T^{\circ}m = 2x(A-T) + 4x(G-C)$ . La transcriptase inverse travaille de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5', on est donc sûr de son bon fonctionnement en extrémité 3' mais moins sûr de son bon fonctionnement en extrémité 5'. Il arrive en effet que l'enzyme se décroche avant d'arriver au bout de l'ARNm (ARN messenger) considéré. Dessiner les amorces à l'extrémité 3' permet donc d'être plus sûr que le couple est bien représentatif de la quantité réelle de transcrits correspondant au gène candidat considéré. C'est pourquoi l'ensemble des couples d'amorces a été dessiné en extrémité 3'. Lorsque cela était possible les amorces ont été dessinées préférentiellement de part et d'autre d'un ou plusieurs introns afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de contamination par de l'ADN. Afin d'améliorer la spécificité des couples d'amorces, l'amorce Reverse a parfois été dessinée dans le 3'UTR (UnTranslated Region), la région transcrite non traduite en extrémité 3' des ARNm. Les UTR 3' et 5' des ARNm sont en effet connues pour être fortement spécifiques. La spécificité *in silico* des différents couples d'amorces a ensuite été vérifiée par alignement sur le génome du pommier.

### 3.2. Matériel biologique

Ce travail repose sur l'exploitation d'échantillons d'ARNm extraits à partir de feuilles de pommiers inoculées ou non par de la tavelure et dont une partie a servi à réaliser une analyse transcriptomique à l'aide de la puce à ADN AryANE V1.0 (Array Apple NimbleGen Expression) en 2011. **Les ARNm étaient donc déjà disponibles lorsque mon stage à commencé.**

#### 3.2.1. Le couple hôte/agent pathogène

Trois génotypes de pommier (*Malus x domestica* Borkh.) ont été choisis pour cet essai selon leur niveau de sensibilité à la tavelure. Il s'agit de la variété 'Gala', connue comme sensible à *Venturia inaequalis*, de la variété 'Fiesta', définie comme partiellement résistante (Trillot *et al.*, 2002 ; Laurens *et al.*, 2004 ; Brun *et al.*, 2008) et du porte-greffe 'MM106'. Les porte-greffes n'ayant que très peu d'organes photosynthétiques en vergers, la connaissance de leurs niveaux de résistance/sensibilité à *V. inaequalis* ne présente pas d'intérêt *a priori*. 'MM106' n'a donc pas été testé expérimentalement vis à vis de la tavelure, néanmoins l'observation de drageons infectés en vergers semble indiquer qu'il présente une forte sensibilité au champignon (communication personnelle C-E Durel). Des scions des trois génotypes ont été greffés sur porte-greffe 'MM106' et cultivés en serre à 18-20°C.

---

## Matériel et Méthodes

---

La souche 104 de *V. inaequalis* est issue de la collection de l'INRA, elle a été obtenue sur la variété 'Golden Delicious' à Saint Lézin (Bénaouf et Parisi, 2000). Il s'agit d'une souche de race 1, virulente sur la majorité des variétés de pommier ne possédant pas de gène majeur de résistance à la tavelure. Elle a été maintenue en collection sur malt-agar en tube à 4°C et multipliée sur plantules de pommiers.

### 3.2.2. Inoculation et prélèvements

Au moment de l'inoculation, les plantes étaient en croissance active et âgées d'environ 9 semaines après greffage. La face supérieure du feuillage des pommiers a été inoculée par pulvérisation d'une suspension de spores ajustée à 250 000 spores/ml en utilisant un compteur de particules (Coulter Counter®, Beckman). Pour favoriser la germination des spores, les plantes ont été placées sous bâche et sous forte hygrométrie 24h avant inoculation et 48 heures après inoculation (Gessler et Stumm, 1984).

L'étage foliaire prélevé, dit « F0 », correspond à la plus jeune feuille ouverte et horizontalement déployée au moment de l'inoculation. Pour chaque répétition biologique, trois plantes ont été prélevées par couple « génotype/temps », chaque échantillon correspond donc à un mélange de trois feuilles.

Pour les prélèvements destinés à l'extraction d'ADN, une seule répétition biologique a été réalisée sur les variétés 'Fiesta' et 'Gala' et cela avant inoculation. Aucune plante 'MM106' n'était disponible pendant mon stage. Pour les prélèvements destinés à l'extraction d'ARN, trois répétitions biologiques ont été réalisées, sur les trois génotypes aux temps avant inoculation (T0), 8 heures et 24 heures post inoculation (hpi). Les feuilles prélevées ont immédiatement été plongées dans l'azote liquide et ont été conservées trois semaines à un trimestre à -80°C avant utilisation.

### 3.3. Analyses moléculaires

#### 3.3.1. Extraction d'ARN

Les ARN des feuilles de pommier ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin®RNA Plant (Macherey-nagel ; Ref 740949-50) puis stockés à -20°C pendant deux ans. En sortie de stockage, ces ARN ont été quantifiés au spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000) et leur pureté a été vérifiée par l'analyse des taux d'absorbance à 230, 260 et 280 nm. Le rapport des mesures obtenues à 260 nm et 280 nm permet d'estimer la contamination protéique tandis que le rapport des mesures obtenues à 260 nm et 230 nm permet d'estimer les contaminations en sucres et polyphénols. Pour l'ensemble des échantillons d'ARN ces deux rapports se trouvent entre 2,06 et 2,35 ce qui atteste de leur pureté (rapport souhaitable compris entre 1,80 et 2,20).

#### 3.3.2. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée selon la méthode « Tanksley à la Paul » (Fulton *et al.*, 1995). Broyer les échantillons congelés avec une tige à eppendorf (environ 200 µl de poudre au final) et ajouter 400µl de tampon. Ce tampon est composé 1) de 41,6 % en volume de tampon d'extraction : 6,38g Sorbitol 0,5 M, 10 ml Tris 1M, 1 ml EDTA 0,5M pH 7,5 dans 100 ml d'eau ; 2) de 41,6 % en volume de tampon de lyse : 20 ml Tris1M, 10 ml EDTA 0,5M

---

## Matériel et Méthodes

---

pH 7,5, 40 ml NaCl 5M, 2 g CTAB pour un volume de 100ml ; 3) de 16,8 % en volume de sarcosyl 5% et 4) de 4,9 mg/ml de sodiumdisulfite). Mettre les échantillons à incuber 30 min à 65°C. Additionner 500 µl de chloroforme, centrifuger 6 min à 10 000 rpm. Pour 1 volume de surnageant récupéré, ajouter 1 volume d'isopropanol et centrifuger 6 min à 10 000 rpm. Eliminer le surnageant et nettoyer avec de l'éthanol à 96%. Centrifuger 6 min à 10 000 rpm, éliminer le surnageant, laisser sécher et resuspendre le culot dans 100 µl d'eau. Les échantillons d'ADN ont ensuite été dosés au Nanodrop ND-1000.

### 3.3.3. La transcription inverse

Une transcription inverse (RT) a été réalisée sur les 26 échantillons à l'aide du kit M-MLV-RT® (Promega ; M1701) afin de travailler sur des ADNc (ADN complémentaire), molécules double brin, plus stables que les ARN. Pour 1,5 µg d'ARN, incorporer 80 unités d'enzymes DNAses puis incuber 20 minutes à 37°C pour éliminer l'ADN des échantillons. Incorporer 1 µl de solution stop (Promega ; M199A) et incuber 10 min à 65°C ; puis ajouter 1µg d'oligo (dT)<sub>15</sub> (Promega ; C1101) et incuber 5 min à 70°C. Mettre immédiatement sur glace pour empêcher la déshybridation des oligo (dT)<sub>15</sub> de la queue polyA et ajouter le mélange réactionnel suivant : 5 µl de dNTP à 16 µM, 5 µl de tampon 5X (M531A), 200 unités de transcriptase inverse et 25 unités de RNases. Incuber 1h à 45°C. Un dosage des ADNc a ensuite été effectué au Nanodrop ND-1000.

### 3.3.4. PCR sur ADN

La PCR (Polymerase Chain Reaction) classique est un processus d'amplification exponentielle qui permet de doser une séquence d'ADN donnée. On parle de dosage semi-quantitatif car celui-ci s'effectue en fin d'amplification (au moins 35 cycles), au niveau du plateau de la courbe exponentielle d'amplification.

Les différents couples d'amorces dessinés ont été initialement testés en PCR classique sur l'ADN de 'Fiesta' et 'Gala'. avec le kit Flexi GoTaq® (Promega, M8305). Dans un volume réactionnel total de 20 µl, ajouter 2 µl d'ADN à 50 ng/µl, 18 µl du mélange suivant : 8,7 µl d'eau, 2 µl de dNTP à 16 µM, 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> à 25mM, 4 µl tampon 5X GoTaq®, 1 µl de chaque amorce à 10 µM et 0,5 unité de GoTaq® DNA polymerase. Le programme utilisé sur le thermocycleur a été: 4 min à 94°C, 38 fois [45 secondes à 94°C, 45 secondes à la température d'hybridation des amorces, 50 secondes à 72°C], 10 min à 72°C. Le produit PCR a ensuite été révélé sous lumière ultra-violette grâce à une coloration au BET, après une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% (p/v) ayant migré pendant 20 min à 135 V.

### 3.3.5. PCR quantitative

La qPCR (PCR quantitative ou PCR en temps réel) consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet donc de faire des mesures quantitatives d'une séquence d'ADN donnée. On caractérise le nombre de cycles C<sub>T</sub> comme la valeur seuil de fluorescence à partir de laquelle la quantité d'ADN amplifiée est reconnue comme supérieure au bruit de fond.

## Matériel et Méthodes

### 3.3.5.1. Spécificité et efficacité des amorces

Afin de vérifier leur spécificité et leur efficacité, les différents couples d'amorces ont été testés en qPCR dans le mélange réactionnel suivant (15 µl au total) : à 3 µl d'ADNc (provenant d'une gamme de dilution « 1/4 ; 1/16 ; 1/64 ; 1/256 ; 1/1024 », ou bien « 1 ; 1/2 ; 1/4 » dans le cas de gènes très peu exprimés), ajouter 0,3 µl de chaque amorce à 10 µM, 7,5 µl de B-R SyBr®Green SuperMix (Quanta; 170-8882BR) et 3,9 µl d'eau. Les amplifications ont été réalisées en utilisant un appareil Opticon 4 Real-Time (Bio-Rad). Le programme suivi a été : 95°C pendant 3 minutes ; 40 fois [95°C pendant 15 secondes, 1 minute à 62°C]. La spécificité des amorces a été vérifiée grâce à la courbe de fusion, obtenue en fin de cycle par augmentation progressive de la température de 55 à 95°C par paliers de 0,5°C. Lorsque l'amplicon se dénature, il libère l'intercalant fluorescent qui génère alors un pic de fluorescence. Une courbe de fusion présentant plus d'un pic de fluorescence révèle donc des amplifications aspécifiques ou encore des dimères d'amorces. Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel MJ Opticon Monitor 3.1 (Bio-Rad).

La droite d'efficacité, d'équation  $C_T = a \times (\log \text{quantity}) + b$ , et son coefficient de détermination sont automatiquement calculés par le logiciel à partir des mesures de fluorescence obtenues pour les dilutions successives de la gamme. L'efficacité « E » des amorces est alors calculée à partir de la formule de Pfaffl (2001),  $E = 10^{(-1/a)}$ . Si les amorces sont efficaces, alors à chaque cycle d'amplification la quantité d'ADNc est doublée et E est alors proche de 2.

### 3.3.5.2. Expression des gènes candidats par PCR quantitative

L'analyse de l'expression de gènes d'intérêts par qPCR repose sur l'utilisation de gènes de référence (ils jouent le rôle de contrôles internes) pour normaliser les échantillons entre eux. Dans notre étude, quatre gènes de référence couramment employés dans l'équipe ont été utilisés. Il s'agit de ACT, GAPDH, TUA et EF1α, dont les caractéristiques sont données dans le tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2.** Caractéristiques des gènes de référence ACT, GAPDH, TUA et EF1α.

Nom gène	Fonction	Accession	Amorce 5'F <sup>1</sup>	Amorce 5'R <sup>2</sup>
ACT	Actin 7	CV151413	CAACCTCTCGTCTGTGATAATG	GCATCCTTCTGTCCCATCC
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CN494000	GCTGCCAAGGCTGTTGGAA	CAGTCAGGTCAACAACGGAAAC
TUA	Tubulin alpha-1 chain	CO065788	GTTCAATGCTGTTGGTGGTG	CTGCGGAGAAGGATAGATGG
EF1α	Elongation Factor	AJ223969	CCTTCTTGAGGCTCTTGACCAG	CCAACAGGAACAGTACCGATAACC

<sup>1</sup> : amorce Forward, <sup>2</sup> : amorce Reverse

## Matériel et Méthodes

---

Les couples d'amorces des gènes candidats et de référence ont ensuite été utilisés pour mesurer l'expression dans des dilutions 1/50<sup>e</sup> des échantillons ADNc (ou des dilutions 1/4 dans le cas des gènes très peu exprimés). Trois répétitions techniques ont été réalisées pour chaque échantillon biologique et pour chaque gène un témoin négatif d'amplification (eau) a également été analysé.

### 3.4. Analyse des données qPCR

La cohérence des données a tout d'abord été vérifiée en supprimant les rares répétitions techniques dont les valeurs de C<sub>T</sub> différaient de plus de deux cycles par rapport aux deux autres répétitions techniques. Afin de pouvoir analyser les différentes plaques qPCR entre elles, la même valeur seuil de détermination du C<sub>T</sub> a été choisie. Pour chaque plaque on demande au logiciel de calculer la fluorescence moyenne FM et son écart-type ETFM pour les cycles 3 à 15 puis de placer le seuil de fluorescence à la position correspondante au calcul FM+10xETFM. On prend alors la valeur seuil la plus haute parmi les valeurs obtenus pour toutes les plaques et on choisit cette valeur comme valeur seuil pour l'ensemble des plaques. La valeur seuil de fluorescence obtenu est « 0,025 ».

L'expression de gènes de référence peut considérablement varier d'une espèce à une autre et d'un organe à l'autre (Vandesompele *et al.*, 2002). C'est pourquoi il est important de vérifier dans toute nouvelle analyse la stabilité des gènes de référence choisis. La méthode d'analyse de stabilité des gènes de référence développée par Vandesompele *et al.* (2002) et précisément explicitée dans Hellemans *et al.* (2007) repose sur le calcul d'une moyenne arithmétique (M) de toutes les variations par paires des gènes de référence testés. Plus M est petit et plus le gène de référence est considéré comme stable. Si M est supérieur à 1,5 alors le gène de référence est considéré comme instable. Si l'on en vient à exclure un gène instable, les calculs doivent être refaits avec les gènes restant afin de s'assurer de leur stabilité dans ce nouveau contexte. Une fois les gènes de référence sélectionnés, les quantités relatives normalisées (NRQ) en ADNc des gènes candidats, dans les différents échantillons (différentes conditions expérimentales) sont calculées à partir des quantités relatives (RQ) (Pfaff *et al.*, 2001 ; Hellemans *et al.*, 2007). La méthode de calcul est la suivante :

Pour la répétition biologique x et pour un gène j donné, avec k l'échantillon considéré et « calibrateur » l'échantillon choisi comme calibrateur, on calcule la quantité relative (RQ) de j dans k à l'aide des formules suivantes, où E est l'efficacité réelle obtenue pour le gène j :

$$\Delta C_{T,j,k} = C_{T,x,j,\text{calibrateur}} - C_{T,x,j,k}$$

$$RQ_{x,j,k} = E^{\Delta C_{T,j,k}}$$

Puis on analyse la stabilité des gènes de référence dans l'expérimentation. Pour chaque gène de référence p, par rapport à un des autres p', on calcule dans l'échantillon k la matrice A<sup>gène</sup> (6x1 pour nous ; 6 colonnes, une par échantillon et 1 ligne) à l'aide de la formule

$$\text{suivante : } A_{p,p',k}^{\text{gène}} = \log_2(RQ_{x,p,k}/RQ_{x,p',k})$$

Ainsi dans notre cas, pour chaque répétition biologique x on calcule trois matrices  $A^{\text{gène}}$  par gène de référence p, autant que de gènes de références autres p' auxquels p est comparé.

On calcule ensuite l'écart-type  $V^{\text{gène}}$  de chaque matrice  $A^{\text{gène}}$  :

$$V_{p,p'}^{\text{gène}} = \sigma(A_{p,p',k}^{\text{gène}})$$

Enfin pour chaque répétition biologique x on calcule la valeur de stabilité  $M^{\text{gène}}$  du gène de référence p considéré, en faisant la moyenne arithmétique des écart-types des f (égal à trois dans notre cas) matrices  $A^{\text{gène}}$  obtenues pour lui :

$$M_p^{\text{gène}} = \frac{\sum_{p'=1}^f (V_{p,p'}^{\text{gène}})}{f}$$

Une fois la stabilité des gènes de référence déterminée, on peut alors calculer pour chaque répétition biologique x et pour chaque échantillon k le facteur de normalisation NF en faisant la moyenne géométrique des RQ obtenus pour les a gènes de référence p stables dans l'expérimentation.

$$NF_{x,k} = \sqrt[\text{a}]{\prod_{p=1}^{\text{a}} RQ_{x,p,k}}$$

On peut alors pour la répétition biologique x, le gène j donné et l'échantillon k considéré normaliser le RQ précédemment calculé avec la formule :

$$NRQ_{x,j,k} = RQ_{x,j,k} / NF_{x,k}$$

Nous avons ensuite calculé pour chaque gène j dans chaque échantillon k la moyenne  $NRQ_{j,k}$  et l'écart-type des  $NRQ_{x,j,k}$  obtenus pour les trois répétitions biologiques réalisées. Les données présentées en résultats sont les transformations logarithmiques en base 2 des  $NRQ_{j,k}$ .

Deux calibrateurs ont été utilisé dans cette étude. Afin d'étudier l'expression avant infection des gènes, les NRQ de 'Fiesta' et 'Gala' ont été calculées par rapport au calibrateur 'MM106'. Dans l'objectif d'étudier l'expression des gènes post-inoculation, les NRQ 8 hpi et 24 hpi pour chacun des génotypes ont été obtenues en prenant le temps avant infection T0 comme calibrateur.

### 3.5. Analyse statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2011 ; ANNEXE I).

Afin de déterminer les différences significatives entre les modalités, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé sur les  $NRQ_{x,j,k}$  obtenus pour les trois répétitions biologiques.



# Résultats

Pour la classification ascendante hiérarchique, les distances euclidiennes entre les modalités correspondent à des mesures de dissimilarités ( $1 - \text{cor}(X, Y)$ ) et la méthode de classification a été une méthode à lien complet. Les « heatmaps » ont été construites en utilisant le package ‘gplots’ (Warnes, 2012). Les valeurs de bootstrap de type AU (Approximative Unbiased) ont été calculées sur la base de 10 000 permutations, en utilisant le package ‘pvcust’ (Suzuki et Shimodaira, 2006). Pour une classe avec une p-value AU > 0,95 l’hypothèse selon laquelle la classe n’existe pas est rejetée au seuil 0,05.

## 4. RESULTATS

La recherche au cours de ce stage de gènes potentiellement impliqués dans la résistance basale chez le pommier s’est organisée en trois parties : 1) la recherche de gènes connus pour être impliqués dans la résistance basale dans la littérature, identifiés chez d’autres espèces végétales que le pommier et notamment *A. thaliana* ; 2) la recherche de gènes homologues chez le pommier, à partir de la séquence génomique disponible pour la variété ‘Golden Delicious’ ; et enfin 3) l’analyse du niveau d’expression de ces candidats par la méthode de qPCR chez les génotypes sensibles à la tavelure ‘Gala’ et ‘MM106’ et chez le génotype partiellement résistant ‘Fiesta’. Cette expression a été analysée avant infection, puis 8 et 24 hpi par *V. inaequalis*.

### 4.1. Les gènes récepteurs et de signalisation impliqués dans la résistance basale

La recherche bibliographique a permis d’identifier 14 gènes qui répondent lors d’attaques fongiques ou bactériennes et qui sont susceptibles d’être impliqués dans le déclenchement de la résistance basale chez le pommier (Tableau 3). Quatre autres gènes ont également été trouvés mais n’ont pas été retenus en raison de leur spécificité trop étroite en termes d’espèce végétale ou d’agent pathogène. Le récepteur Xa21 semble reconnaître uniquement les PAMPs des espèces bactériennes du genre *Xanthomonas*. Le récepteur EFR ne serait présent que chez les Brassicacées et les récepteurs EIX1 et EIX2 ont seulement été mis en évidence chez la tomate. Enfin, BIK1 n’a pas non plus été retenu car l’objectif n’était pas d’approfondir la cascade de transduction.

**Tableau 3.** Répertoire des gènes récepteurs et de signalisation identifiés au sein de la littérature comme impliqués dans la résistance basale et susceptibles de fonctionner chez le pommier.

Fonction	Nom	Accession*	Fonction	Nom	Accession*
PRR pour PAMPs bactériens	FLS2	At5g46330	PRR pour DAMPs	PEPR1	At1g73080
	LYM1	At1g21880		PEPR2	At1g17750
	LYM3	At1g77630		WAK1	At1g21250
PRR pour PAMPs fongiques	CERK1	At3g21630	MAPK	MPK3	At3g45640
	CEBiP	At2g17120	WRKY	MPK6	At2g43790
	GBP	At5g15870		WRKY22	At4g01250
Co-récepteur	BAK1	At4g33430	WRKY29	At4g23550	

\* chez *A. thaliana*

## Résultats

---

La sélection comprend des gènes récepteurs de PAMPs ou DAMPs et des gènes impliqués dans la transmission du signal, de types MAPK et WRKY. Pour ces deux derniers types de gènes, seuls ceux reconnus dans la littérature comme spécifiquement impliqués dans la résistance basale ont été conservés.

### 4.2. Les gènes du pommier potentiellement homologues aux gènes récepteurs et de signalisation impliqués dans la résistance basale

Une fois les gènes impliqués dans la résistance basale sélectionnés, l'étape suivante a été d'identifier chez le pommier leurs gènes homologues. Un tblastx a donc été réalisé entre la séquence traduite de chaque gène et la séquence traduite du génome du pommier. Les caractéristiques des gènes homologues les plus probables, trouvés chez le pommier, sont synthétisées dans le tableau 4.

Deux gènes prédits ont parfois été sélectionnés comme candidats potentiels chez le pommier, l'un des deux a donc été nommé avec le suffixe « bis » pour éviter les confusions. Ainsi, dans la recherche de gènes homologues au gène CEBiP d'*A. thaliana* (AtCEBiP), deux gènes ont été retenus : MDP0000215219 (CEBiP) et MDP0000209598 (CEBiPbis), de séquences peptidiques similaires (100% d'homologie). Toutefois, comme AtCEBiP, CEBiP possède quatre exons tandis que CEBiPbis n'en compte que trois. Deux gènes prédits ont également été sélectionnés comme candidats pour le gène GmGBP du soja, les gènes portant les identifiants MDP0000148377 (GBP) et MDP0000206670 (GBPbis). Ils présentent des différences de séquences peptidiques (65% d'homologie). Enfin, lors de la recherche de gènes homologues à WAK1 d'*A. thaliana* (AtWAK1), on a obtenu comme candidats les mêmes gènes prédits que lors du tblastx avec AtWAK2, AtWAK3 et AtWAK5, des WAKs génétiquement voisines de AtWAK1. Pour ces quatre WAKs, le meilleur alignement s'est révélé être celui obtenu avec le gène prédit portant l'identifiant MDP0000170906. Ce gène prédit (WAK1) ainsi qu'un second, portant l'identifiant MDP0000193564 (WAK1bis), ont été choisis pour être testés en qPCR. WAK1bis est obtenu comme second meilleur alignement pour AtWAK1 et comme sixième alignement pour les autres WAKs.

Les alignements de séquence réalisés à partir de PEPR1 puis de PEPR2 d'*A. thaliana* (AtPEPR1 et AtPEPR2), ont abouti au même gène prédit portant l'identifiant MDP0000298511, avec des scores très proches. Définir ce gène prédit comme homologue de AtPEPR1 ou AtPEPR2 n'est donc pas évident. Aucun autre gène prédit n'a pu être retenu au vu des forts écarts de séquences obtenus vis à vis de AtPEPR1 ou de AtPEPR2. AtPEPR1 étant le récepteur principal, j'ai choisi d'appeler MDP0000298511 PEPR1 dans la suite de cette étude.

Dans le cas des gènes de type WRKY, aucun gène prédit n'a finalement pu être sélectionné car quelque soit le WRKY choisi (les WRKY 22 ou 29, reconnus comme spécifiquement impliqués dans la résistance basale ou bien d'autres WRKY) les alignements donnaient les mêmes résultats. Il était donc impossible de déterminer clairement les homologues putatifs de chaque WRKY et retenir certains d'entre eux ne nous aurait pas permis de conclure quant à leur rôle dans la résistance basale. En effet, dans nos analyses nous observons ce qui se passe post infection, soit lors du cumul des différentes



## Résultats

manifestations de résistance, dont fait partie la PTI, et c'est la fonction des gènes qui nous permet de dire que nous observons *a priori* de la résistance basale et non autre chose. En absence d'assurance sur cette fonction il nous est donc impossible de conclure.

**Tableau 4.** Caractérisation des gènes prédits du pommier potentiellement homologues aux gènes récepteurs et de signalisation impliqués dans la résistance basale, d'après leur identifiant ([http://www.rosaceae.org/species/malus/malus\\_x\\_domestica/genome\\_v1.0](http://www.rosaceae.org/species/malus/malus_x_domestica/genome_v1.0)), le chromosome qui les porte, et l'existence de transcrits RNAseq dans les bases de données internes au laboratoire ou d'EST dans la base du NCBI.

Nom	Identifiant	Chr. <sup>1</sup>	Fréquence de transcrits RNAseq <sup>2</sup>	Présence d'une accession dans la base d'EST de NCBI <sup>2</sup>
FLS2	MDP0000254122	5	++	ABS
LYM1	MDP0000182890	3	++	EB154101
LYM3	MDP0000135937	12	++	EB154101
CERK1	MDP0000175360	17	++	ABS
CEBiP	MDP0000215219	10	ABS	CV150073
CEBiPbis	MDP0000209598	10	ABS	CV150073
GBP	MDP0000148377	9	++	GO501946
GBPbis	MDP0000206670	17	ABS	ABS
BAK1	MDP0000291093	2	+	CN891664
PEPR1	MDP0000298511	17	ABS	ABS
WAK1	MDP0000170906	13	ABS	ABS
WAK1bis	MDP0000193564	8	ABS	ABS
MPK3	MDP0000199036	11	ABS	CO903837
MPK6	MDP0000340624	15	++	GO501574

<sup>1</sup>: chromosome portant le gène

<sup>2</sup>: ABS: absence de transcrits RNAseq ou d'EST, +: présence de transcrits pouvant correspondre au gène, ++: forte présence de transcrits pouvant correspondre au gène.

On constate que la plupart des gènes prédits retenus sont localisés sur des chromosomes différents (Tableau 4), à l'exception de GBPbis, PEPR1 et BAK1 qui sont tous trois situés sur le chromosome 17 et de CEBiP et CEBiPbis qui sont situés sur le chromosome 10. On observe également que MPK3 et MPK6, de même famille moléculaire et tous deux proches phylogénétiquement (Ichimura *et al.*, 2002), sont sur deux chromosomes différents (chromosome 11 et chromosome 15 respectivement). Pour certains des gènes prédits des transcrits obtenus par RNAseq sont disponibles, ce qui tend à valider l'expression du gène correspondant. Il s'agit de FLS2, LYM1, LYM3, CERK1, GBP, BAK1 et MPK6. A l'inverse, l'absence de transcrits n'exclut pas l'existence de ces gènes, ils peuvent simplement ne pas être exprimés dans les échantillons présents dans la base de données. La recherche d'EST a permis de mettre en évidence que des parties de séquence des gènes CEBiP et CEBiPbis, GBP, MPK3, MPK6 ont été identifiées et reconnus comme respectivement homologues aux gènes AtCEBiP, BnGBP, AtMPK3, PcMPK6.

### 4.3. Analyse de l'expression des gènes candidats par qPCR

L'analyse du niveau d'expression des 14 gènes candidats par la méthode de qPCR a été réalisée chez les variétés sensibles à la tavelure 'Gala' et 'MM106' et chez la variété partiellement résistance 'Fiesta'. Cette expression a été analysée au niveau constitutif (avant infection) puis 8 et 24 hpi par *V. inaequalis* pour les gènes candidats susceptibles d'être induits par des champignons. Une fois la pureté des échantillons utilisés vérifiée, la première

## Résultats

---

étape consiste à établir des couples d'amorces spécifiques aux gènes candidats et suffisamment efficaces pour permettre une évaluation fiable des quantités d'expression.

### 4.3.1. Pureté et homogénéité des échantillons ADN et ADNc

La vérification de la pureté des échantillons ADN et ADNc a montré une absence de contamination par des sucres : le rapport des mesures de fluorescence à 260 nm (acide nucléique) et 230 nm (sucres) était d'environ 2 quelque soit l'échantillon. On a également relevé peu de contaminations de nature protéique pour les échantillons ADN : le rapport des mesures de fluorescence à 260 nm et 280 nm (protéines) était supérieur à 1,8 (un rapport de 2 est obtenu pour un échantillon non contaminé). Par contre les rapports obtenus pour les échantillons ADNc étaient proches de 1,6, révélant ainsi la présence de protéines. Toutefois, la longueur d'onde utilisée en qPCR étant 230 nm, l'éventuelle contamination protéique observée pour les échantillons ADNc ne devrait pas engendrer de perturbations dans la mesure de l'expression des gènes par qPCR. Enfin, les concentrations des échantillons étaient homogènes : comprises entre 775 et 1050 ng/ $\mu$ l pour les échantillons ADN et entre 1077 et 1323 ng/ $\mu$ l pour les échantillons ADNc.

### 4.3.2. Spécificité et efficacité des couples d'amorces

#### 4.3.2.1. Sélection des meilleurs couples d'amorces

Les meilleurs couples d'amorces pour chaque gène candidat (Tableau 5) ont été choisis de manière à être spécifiques *in silico* et positionnés en extrémité 3' des ARNm. Lorsque cela a été possible, 1) les amorces ont été dessinées de part et d'autre d'un ou plusieurs introns, pour s'assurer d'une absence de contamination ADN, 2) l'amorce Reverse a été choisie dans l'UTR3' pour augmenter la spécificité du couple d'amorces.

Bien que les amorces de CEBiP soient spécifiques, aucun couple d'amorce n'a pu être dessiné pour CEBiPbis par manque de spécificité car elles s'alignaient sur CEBiP ou sur d'autres gènes prédits. En effet, les amorces de CEBiP ont été dessinées sur l'exon que ne possède pas CEBiPbis.

Pour l'ensemble des couples d'amorces, les tailles attendues des amplicons sur ARNm sont comprises entre 153 et 205 pb. Sur ADN, les tailles attendues des amplicons sont identiques à celles sur ARNm ou bien supérieures, dans le cas où un ou plusieurs introns sont présents entre les deux amorces. Les températures maximales d'hybridation des couples d'amorces sur leurs cibles sont comprises entre 58°C et 62°C.

## Résultats

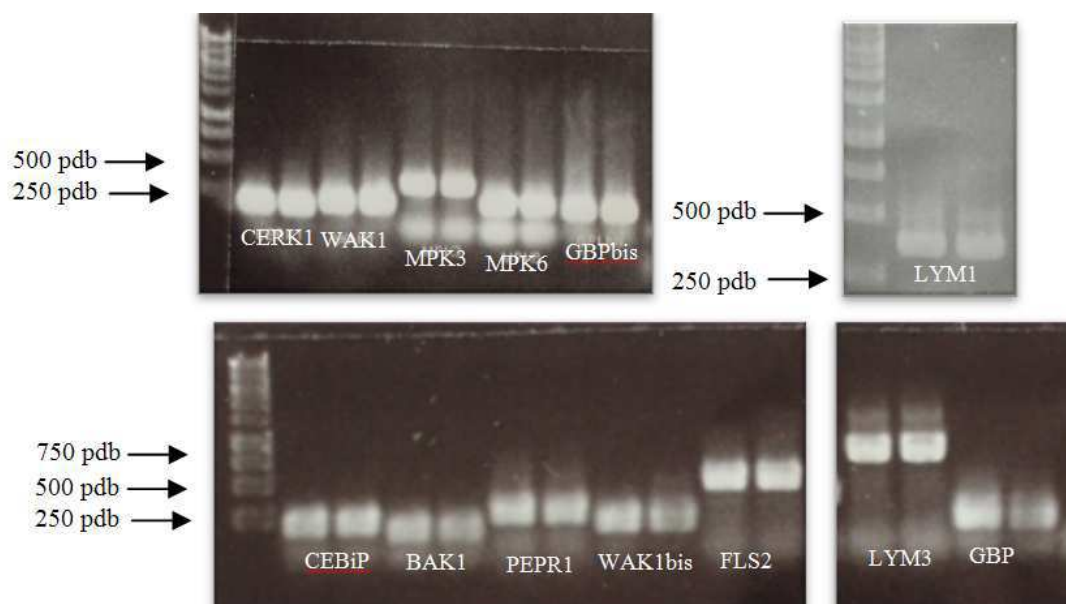
**Tableau 5.** Caractéristiques des couples d'amorces choisies pour chaque gène candidat

Gène	Amorce 5'F <sup>1</sup>	Amorce 5'R <sup>2</sup>	Taille attendue de l'amplicon sur ADN	Taille attendue de l'amplicon sur ARNm	T°m <sup>3</sup>
FLS2	CTCAGCATCAGCTTTCCAAG	TGAGACAAGCTCACTGGCAG	472	177	60
LYM1	AGTGCTTCTGATGCCTGCTC	TAACGAGGAAGGCTCTACCC	362	202	62
LYM3	GTAGAAACAGTAACCTCATGG	ACGGATTACTGAGGTAGGTG	758	194	60
CERK1	GAAGCTGTTGTAAGCGGA	AGAGGCTGTTGTCTAATGGC	153	153	58
CEBiP	GCAACAGCACATCCGGTTG	AATCGAATATGGTCCCCGAC	203	153	60
GBP	GAGAGGAAGCAGCGGAATTC	CAGGTAAATACAACGGGATCG	197	197	62
GBPBis	TGATGTCGGGTTTGCTAGTG	TTCCATCGTCGAATTCTTCC	164	164	58
BAK1	AGTGGCAGAAAGAGGAGGTG	AAGGCTTCTTACGTGCATCC	161	161	60
PEPR1	TTGGACTCTGACATGGAGCC	CTGTACACGTCAGATTCCAC	250	164	60
WAK1	AGACTGAGTACTTGCTCAAC	CATCCACTAGCTAAAAGACAG	205	205	58
WAK1bis	GGCTGAGAAGGATGGTCATG	AGACTTGGTTCACCTGGCACG	200	200	62
MPK3	TGGCATTGATCTTGTGAC	CATTGCTCTTCTCCAAGG	292	176	58
MPK6	ATCAGTGATGAGCCTGTTG	ACCTAGAGACCACACAATTG	182	182	58

<sup>1</sup> : amorce Forward, <sup>2</sup> : amorce Reverse, <sup>3</sup> : Température maximale d'hybridation du couple

### 4.3.2.2. Vérification de la spécificité des couples d'amorces par PCR sur ADN

Une première vérification du fonctionnement et de la spécificité des couples d'amorces choisis a été réalisée par PCR sur l'ADN génomique des variétés 'Gala' et 'Fiesta'. Les résultats de cette PCR (Figure 9) montrent que pour chaque couple d'amorce un unique produit PCR est amplifié, de taille attendue (cf tableau 5 colonne 4) et de même taille pour les deux variétés. Aucune bande n'a été révélée dans les témoins négatifs.



**Figure 9.** Révélation des produits PCR sous ultra-violets, suite à l'utilisation des couples d'amorces choisis. Pour chacun des gènes, l'ADN 'Fiesta' se situe à droite et l'ADN 'Gala' à gauche. L'amplification des amorces pour CERK1, WAK1, MPK3, MPK6 et GBPBis a été faite à 58°C, celles pour CEBiP, BAK1, PEPR1, WAK1bis, FLS2, LYM3 et GBP à 60°C et celles pour LYM1 à 62°C.

## Résultats

### 4.3.2.3. Spécificité des couples d'amorces et efficacité par qPCR

La qPCR sur une gamme de dilution réalisée à partir d'un mélange de tous les ADNc analysés dans ce travail a permis de déterminer pour chaque couple d'amorces les conditions d'expérimentation permettant leurs meilleures efficacités. Ainsi, la quantité en amorces a été choisie de manière à maintenir l'efficacité tout en limitant la création de dimères d'amorces (Tableau 7). Pour CEBiP, CERK1, WAK1 et GBPbis, l'efficacité des couples d'amorces correspondants a été calculée à partir d'une gamme de dilution plus concentrée que celle utilisée pour les autres car ces gènes s'avèrent très peu exprimés. Malgré cela, aucune efficacité n'a pu être calculée pour WAK1 et GBPbis. Pour GBP, les courbes de fusion montraient une contamination qui s'est finalement avérée concerner les solutions mères d'amorces. Il n'a par la suite pas été possible d'aller plus loin dans l'analyse de l'expression du gène GBP chez le pommier, faute de temps.

**Tableau 7.** Caractéristiques des couples d'amorces choisis pour amplifier les gènes potentiellement impliqués dans la résistance basale chez le pommier.

Nom	Quantités finales en amorces F et R (nM)	Efficacité (%)	$C_{T(1/50)}$ <sup>1</sup> (cycle)	$C_{T(eau)}$ <sup>2</sup> (cycle)	Nom	Quantités finales en amorces F et R (nM)	Efficacité (%)	$C_{T(1/50)}$ <sup>1</sup> (cycle)	$C_{T(eau)}$ <sup>2</sup> (cycle)
FLS2	250	100	28,4	38,0	EF	250	97	26,6	NA
BAK1	200	100	25,4	33,9	ACT	250	93	29,3	NA
WAK1bis	250	100	27,1	33,1	TUA	250	93	26,9	NA
MPK3	200	95	26,1	37,0	GAPDH	250	96	23,4	NA
MPK6	250	88	27,3	34,2	CEBiP *	250	99	28,7**	32,7
LYM3	250	100	28,4	38,8	CERK1*	250	100	29,8**	NA
PEPR1	200	92	28,3	NA	LYM1 *	250	90	26,4**	34,6

<sup>1</sup> valeur seuil,  $C_T$ , détectée pour une dilution 1/50<sup>ème</sup> du mélange d'ADNc, dilution retenue pour réaliser les qPCR sur les échantillons, <sup>2</sup> valeur seuil,  $C_T$ , obtenue pour le témoin négatif : l'eau, \*Gamme de dilution plus concentrée, \*\*Valeur du  $C_T$  pour une dilution 1/4 du mélange d'ADNc, dilution retenue pour réaliser les qPCR concernant les gènes très peu exprimés. NA : non amplifié.

On constate que les efficacités des couples d'amorces sont toutes comprises entre 92% et 100% sauf pour MPK6 où elle ne dépasse pas 88%. Aucune amplification n'a été obtenue dans les témoins négatifs (de l'eau) pour PEPR1, CERK1 et pour les quatre gènes de référence EF, ACT, TUA et GAPDH. Par contre, les autres couples d'amorces s'avèrent former des dimères en absence de matrice (dans le témoin négatif présence d'un pic avec une température de dénaturation inférieure à celle obtenue pour l'amplicon dans les échantillons) (tableau 6). Toutefois, les  $C_T$  obtenus dans l'eau pour ces dimères sont compris entre 32 et 39, soit en moyenne huit  $C_T$  plus tard que le  $C_T$  obtenu pour l'amplicon dans les échantillons. Nous avons donc estimé que ces dimères n'étaient pas susceptibles de fausser nos résultats, ce qui s'est vérifié par la suite. En effet, pour ces gènes, les  $C_T$  obtenus pour les échantillons étaient tous minimum dix  $C_T$  plus faible par rapport à ceux obtenus dans le témoin négatif. Une exception cependant, pour le gène CEBiP qui ne présente que trois  $C_T$  d'écart.

## Résultats

### 4.3.3. Analyse de l'expression des gènes candidats par qPCR

#### 4.3.3.1. Stabilité des gènes de référence

L'expression des gènes de référence peut considérablement varier d'une espèce à une autre et au sein d'une même espèce, d'un organe à l'autre. Il est donc important de vérifier leur stabilité dans toute nouvelle étude. La valeur de stabilité M (Vandesompele *et al.*, 2002), pour chacun des quatre gènes de référence analysés, est donnée dans le tableau 8. On a deux M par gène de référence, selon le calibrateur choisi dans les calculs : le T0 pour chaque génotype ou bien le porte-greffe 'MM106' à chaque temps de la cinétique. On peut constater que pour l'ensemble des gènes et quelque soit le calibrateur, les valeurs de M sont inférieures à 1,5 et relativement stables (valeurs comprises entre 0,24 et 0,67). On peut donc conclure que nos quatre gènes ACT, EF, TUA, et GAPDH sont stables dans notre expérimentation et peuvent tous les quatre être utilisés pour normaliser l'expression des gènes à analyser.

**Tableau 8.** Valeurs de stabilité M des gènes de référence

Gène de référence	M (calibrateur 'MM106')	Ecart-type (calibrateur 'MM106')	M (calibrateur T0)	Ecart-type (calibrateur T0)
ACT	0,54	0,12	0,46	0,15
EF	0,40	0,10	0,40	0,16
TUA	0,49	0,09	0,51	0,16
GAPDH	0,52	0,07	0,49	0,12

#### 4.3.3.2. Niveau d'expression des gènes candidats

L'ensemble des données présentées sont celles obtenues après transformation logarithmique en base 2 des ratios (Tableaux 9 et 10). Un premier clustering hiérarchique des modalités « génotype x temps de cinétique d'infection » a été réalisé en fonction du profil d'expression obtenu pour les gènes candidats. La figure 10.A présente la « heatmap » et le dendrogramme associés. Le calibrateur choisi pour ce premier clustering est le génotype 'MM106'. Ainsi, pour chaque temps de la cinétique, les niveaux d'expression chez 'Fiesta' et 'Gala' sont exprimés relativement à ceux obtenus chez 'MM106'. Un deuxième clustering hiérarchique a été effectué avec cette fois-ci pour calibrateur le temps T0 pour chaque génotype. La « heatmap » et le dendrogramme associés, présentés dans la figure 10.B, correspondent donc aux niveaux d'expression des gènes post-inoculation relativement à ceux avant inoculation, chez les trois génotypes.

Les valeurs de bootstrap sur les branches des deux dendrogrammes sont supérieures à 70% (Figure 10). Elles montrent donc que pour chaque association deux à deux, on a plus de 70 chances sur 100 de ne pas se tromper en associant les modalités comme indiqué plutôt qu'autrement.

Pour 'Fiesta' comme pour 'Gala', quelque soit le temps de la cinétique, on voit que la majorité des gènes sont plus exprimés que chez 'MM106' (Figure 10.A). On observe par ailleurs que les modalités concernant une variété se regroupent entre elles et sont éloignées de celles se rapportant à l'autre variété : 'Fiesta' et 'Gala' réagissent donc différemment l'un de l'autre quand on les compare à 'MM106' (Figure 10.A). Ce résultat est statistiquement

## Résultats

significatif dans le cas de l'observation des gènes LYM3 et CEBiP (Tableau 9 ; respectivement p-value 0,03 et 0,02). Alors que pour 'Fiesta' les niveaux d'expression des gènes, initialement supérieurs, ont tendance à se rapprocher de ceux obtenus pour 'MM106' post inoculation, pour 'Gala', ces niveaux d'expression restent supérieurs à ceux obtenus pour 'MM106' tout au long de la cinétique (Figure 10.A).

Concernant les trois génotypes, on observe globalement une répression post-inoculation (Figure 10.B). Cette répression touche plus de gènes chez 'Fiesta' que chez 'Gala' et 'MM106'. Alors que cette répression des gènes semble augmenter entre 8 et 24 hpi chez 'Fiesta', les profils d'expression apparaissent globalement similaires au cours du temps chez 'Gala' comme chez 'MM106', ce qui est statistiquement validé pour les gènes BAK1, LYM3, MPK6, MPK3, PEPR1, LYM1 et CERK1 (Tableau 10). La répartition des modalités dans ce clustering semble être essentiellement due au gène WAK1bis, qui réagit de manière contrasté entre d'une part 'MM106' et les deux autres variétés et d'autre part entre 8 et 24 hpi pour ces deux autres variétés (Tableau 10 ; p-value 0,04).

On peut distinguer 4 groupes de gènes en fonction de leur profil d'expression par rapport aux modalités. Post-inoculation WAK1bis est induit chez 'MM106' et réprimé chez 'Gala' et 'Fiesta' (figure 10.B). Ce gène est par ailleurs toujours plus exprimé chez 'Fiesta' et 'Gala' par rapport à 'MM106' (Figure 10.A). CERK1, MPK6, LYM1, CEBiP et FLS2 sont réprimés post-inoculation chez les trois génotypes (au moins à un des deux temps pour FLS2) (Figure 10.B) et sont majoritairement plus exprimés chez 'Fiesta' et 'Gala' par rapport à 'MM106' (Figure 10.A), à l'exception de CEBiP qui est moins exprimé chez 'Fiesta' par rapport à 'MM106'. Post-inoculation, BAK1, MPK3 et PEPR1 sont réprimés chez 'Fiesta' alors que leur expression ne varie globalement pas chez 'Gala' et 'MM106'. Ces gènes sont également plus exprimés chez 'Fiesta' et 'Gala' par rapport à 'MM106', à l'exception de PEPR1 qui est moins exprimé chez 'Fiesta' par rapport à 'MM106' (Figure 10.A). Enfin LYM3 est induit post-inoculation chez 'Fiesta' alors que son expression ne varie globalement pas chez 'Gala' et 'MM106'. Ce gène est par ailleurs toujours plus fortement exprimé chez 'Gala' par rapport à 'Fiesta' et 'MM106'.

**Tableau 9.** Expression des gènes candidats chez 'Fiesta' et 'Gala' par rapport à 'MM106', à T0, 8 hpi et 24 hpi. Les données présentées sont les transformations logarithmiques en base 2 des NRQ, classées selon la hiérarchisation de la heatmap figure 10.A.

Gène / Modalité	WAK1bis	CEBIP	LYM3	LYM1	FLS2	PEPR1	BAK1	CERK1	MPK6	MPK3
'Fiesta' T0	2,61 a	-0,94 cd	-0,81 c	0,53 a	0,43 a	0,05 a	0,67 a	0,27 a	0,32 a	0,32 a
'Fiesta' 8 hpi	0,24 d	0,04 bc	0,00 b	0,40 a	0,27 a	-0,31 a	-0,04 ab	0,27 a	0,04 a	0,20 a
'Fiesta' 24 hpi	1,05 bc	-1,16 d	-0,11 bc	0,20 ab	0,34 a	-0,14 a	-0,12 b	0,09 a	0,08 a	-0,02 a
'Gala' T0	2,18 ab	1,37 a	0,19 ab	-0,14 ab	0,28 a	-0,03 a	0,30 ab	0,44 a	0,27 a	0,22 a
'Gala' 8 hpi	0,65 cd	1,29 a	0,90 a	0,33 ab	-0,24 a	0,02 a	0,32 ab	0,58 a	0,38 a	0,35 a
'Gala' 24 hpi	0,72 cd	1,06 ab	0,12 ab	-0,47 b	0,07 a	0,33 a	0,41 ab	0,43 a	0,30 a	0,39 a
p-value <sup>1</sup>	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> p-value issus d'un test non paramétrique Kruskal Wallis, ns : résultat non significatif, \* : résultat significatif à 0,01

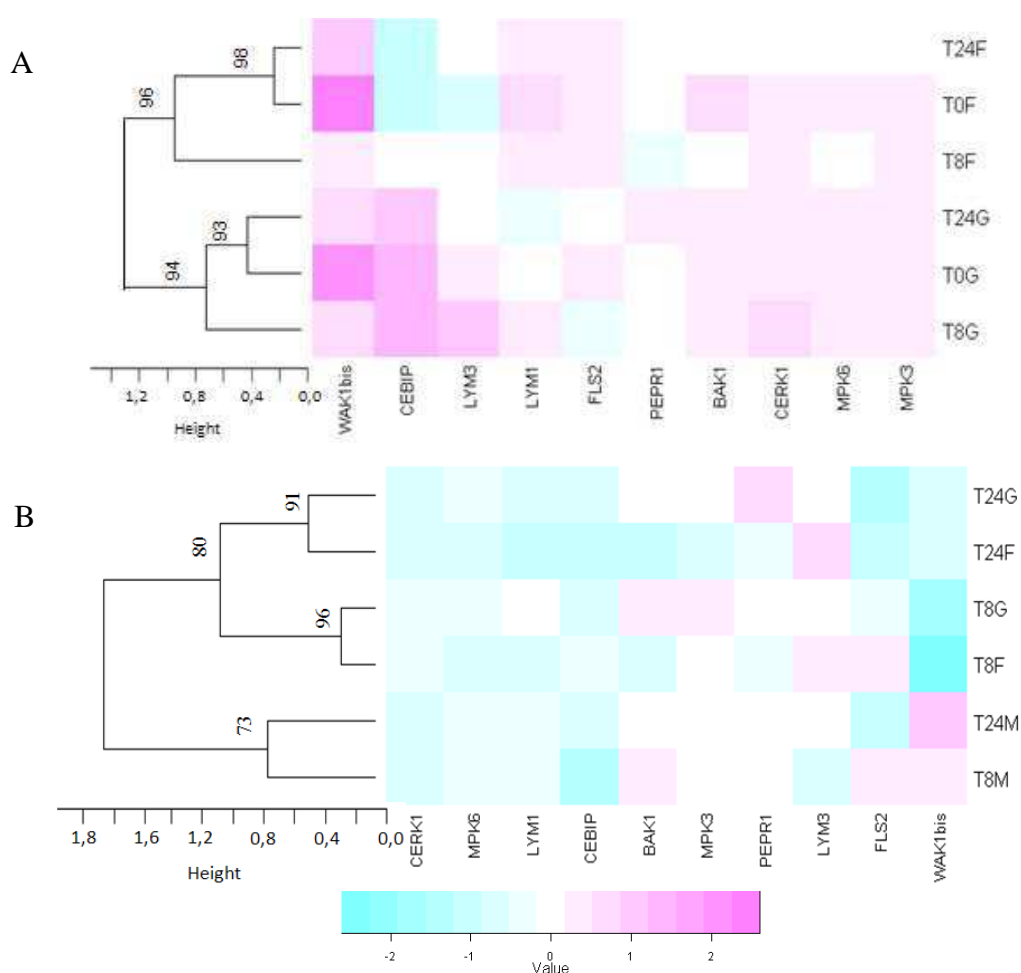


## Résultats

**Tableau 10.** Expression des gènes candidats chez 'Fiesta', 'Gala' et 'MM106', à 8 hpi et 24 hpi par rapport à T0. Les données présentées sont les transformations logarithmiques en base 2 des NRQ classées selon la hiérarchisation de la heatmap figure10.B.

Gène Modalité	CERK1	MPK6	LYM1	CEBIP	BAK1	MPK3	PEPR1	LYM3	FLS2	WAK1bis
'Fiesta' 8 hpi	-0,39 a	-0,65 a	-0,45 a	-0,26 a	-0,51 bc	-0,01 ab	-0,28 a	0,37 ab	0,25 a	-2,11 d
'Fiesta' 24 hpi	-0,65 a	-0,64 a	-0,70 a	-0,82 bc	-0,74 c	-0,49 b	-0,25 a	0,51 a	-0,95 b	-0,66 b
'Gala' 8 hpi	-0,25 a	-0,26 a	0,13 a	-0,61 ab	0,18 a	0,20 a	0,06 a	0,11 ab	-0,17 a	-1,30 c
'Gala' 24 hpi	-0,49 a	-0,31 a	-0,58 a	-0,49 ab	0,12 ab	-0,10 ab	0,44 a	-0,01 ab	-1,19 b	-0,43 b
'MM106' 8 hpi	-0,43 a	-0,32 a	-0,34 a	-1,22 c	0,18 a	0,04 ab	0,02 a	-0,47 b	0,42 a	0,24 a
'MM106' 24 hpi	-0,46 a	-0,36 a	-0,29 a	-0,54 ab	0,04 abc	-0,14 ab	-0,04 a	-0,04 ab	-0,88 b	0,91 a
p-value <sup>1</sup>	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	*

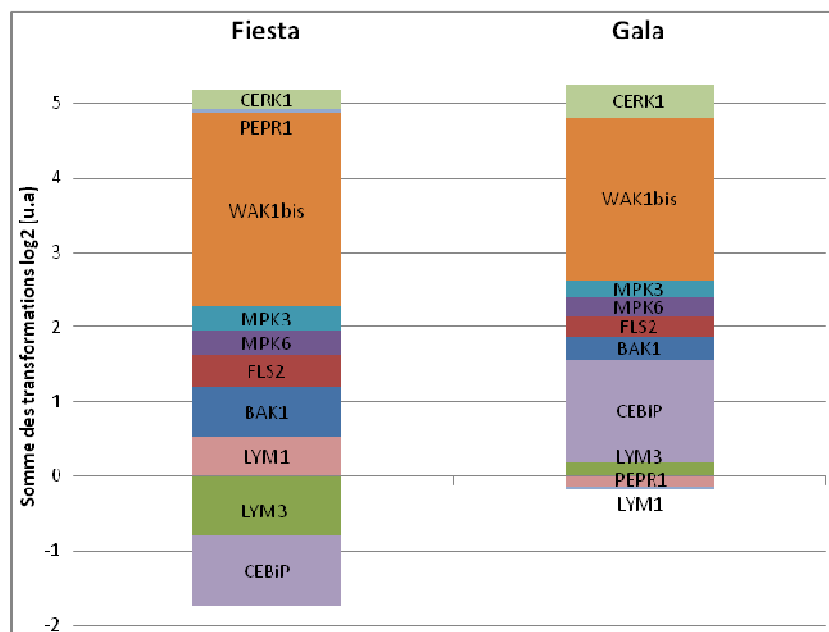
<sup>1</sup> p-value issus d'un test non paramétrique Kruskal Wallis, ns : résultat non significatif, \* : résultat significatif à 0,01



**Figure 10.** Représentations sous forme de « heatmap » et clustering hiérarchique des transformations logarithmiques (base 2) des ratios d'expression des gènes candidats A) chez 'Gala' et 'Fiesta' par rapport à 'MM106' à T0, 8 hpi et 24 hpi et B) chez les trois variétés par rapport à T0 à 8 hpi et 24 hpi. Les modalités sont les suivantes : T24F ('Fiesta' 24 hpi), T0F ('Fiesta' T0), T8F ('Fiesta' 8 hpi), T24G ('Gala' 24 hpi), T0G ('Gala' T0), T8G ('Gala' 8 hpi), T8M ('MM106' 8 hpi) et T24M ('MM106' 24 hpi). A partir de la matrice de dissimilarités (distance euclidienne), la méthode de clustering hiérarchique utilisée pour regrouper les modalités a été une méthode ascendante à lien complet. Les valeurs de bootstrap de type AU (Approximative Unbiased) ont été calculées sur la base de 10 000 permutations.

## Discussion

Afin d'avoir une idée de la quantité totale d'expression que représentent, au niveau préformé (T0), les dix gènes candidats analysés comme potentiellement impliqués dans la résistance basale, un histogramme cumulé des transformations logarithmiques en base 2 des NRQ a été réalisé (Figure 11). On constate, comme dans la figure 9, que pour la majorité des gènes l'expression est supérieure chez 'Fiesta' et 'Gala' par rapport à 'MM106'. De plus, excepté pour les gènes CEBiP, LYM3 et CERK1, l'expression des gènes est supérieure chez 'Fiesta' par rapport à 'Gala' mais de manière statistiquement non significative.



**Figure 11.** Histogrammes cumulés des transformations logarithmiques en base 2 des NRQ de chaque gène pour 'Fiesta' et 'Gala' par rapport à 'MM106' à T0.

## 5. DISCUSSION

Pour développer des variétés de pommier à résistance durable contre *V. inaequalis*, l'une des stratégies envisagée est de favoriser les variétés à résistance partielle, plus difficilement contournable par les agents pathogènes (Durel *et al.*, 2007). La résistance basale, composante fonctionnelle de la résistance partielle, est *a priori* présente chez toutes les espèces végétales (Jones et Dangl, 2006). L'objectif de cette étude est de caractériser la résistance basale de la variété à résistance partielle 'Fiesta' à travers l'analyse de l'expression des gènes du pommier sélectionnés comme potentiellement homologues à ceux impliqués dans la résistance basale.

L'observation des phénotypes 29 jours post-inoculation a montré que dans cette expérimentation, deux des trois génotypes ont résisté de manière plus importante que ce que l'on aurait pu attendre (Annexe II). Si 'Gala' a bien présenté un phénotype de sensibilité avec l'apparition de zones de sporulation sur l'ensemble de la feuille ainsi que des nécroses étendues, 'Fiesta', attendue comme partiellement résistante, s'est avérée particulièrement résistante à la souche 104. Les feuilles ne présentaient que de rares zones de chlorose, peu étendues. Quant à 'MM106', contrairement à ce qui était attendu, il s'est révélé bien plus résistant que 'Gala' mais tout de même plus sensible que 'Fiesta', avec des symptômes



---

## Discussion

---

étendus de chlorose et une déformation des feuilles. Aucune sporulation n'a été observée chez ce porte-greffe tout comme chez 'Fiesta' (Annexe II).

### 5.1. Le déclenchement de la PTI

Dix gènes du pommier, potentiellement homologues aux gènes AtFLS2, AtLYM1, AtLYM3, AtCERK1, AtCEBiP, AtBAK1, AtPEPR1, AtWAK1, AtMPK3 et AtMPK6 ont été analysés en qPCR chez les trois génotypes 'Gala', 'MM106' et 'Fiesta', avant et post-inoculation. Une étude de Gessler et Stumm (1984) a mis en évidence que presque toutes les conidies de *V. inaequalis* germent et développent un appressorium *in planta* dans les 15 heures suivant l'inoculation. Dans notre étude, des photographies au microscope électronique à balayage, 8h et 24h post-inoculation, ont montré le développement d'un appressorium et un début de pénétration dès 8 hpi (Annexe III). La PTI se déclenchant très rapidement lors d'une infection (pour revue : Boller et Felix, 2009), on peut penser qu'elle a bien débutée entre 8h et 24h post-inoculation dans notre expérimentation.

### 5.2. Expression préformée des gènes chez 'Fiesta' et 'Gala'

Bien que cela ne soit pas statistiquement significatif, l'expression avant inoculation de la plupart des gènes s'est révélée plus élevée chez 'Fiesta' que chez 'Gala', sauf dans le cas de CERK1, CEBiP et LYM3 qui sont plus exprimés chez la variété sensible et de manière statistiquement significative pour ces deux derniers gènes (Tableau 10 ; Figure 11). Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse vérifiée pour le pathosystème riz/*Magnaporthe grisea* et selon laquelle l'expression préformée des gènes impliqués dans la résistance est globalement plus élevée chez les variétés à résistance partielle par rapport aux variétés sensibles (Vergne *et al.*, 2010).

### 5.3. Les récepteurs de PAMPs bactériens

Une expérimentation supplémentaire avec une infection par la bactérie *Erwinia amylovora* avait été envisagée au début de ce stage. Cependant, un enchaînement d'imprévus expérimentaux ne nous a pas permis de la réaliser. Dans cette étude, l'infection ayant été faite par un champignon, il ne nous est pas possible d'établir de conclusion sur l'expression post-inoculation des gènes récepteurs de PAMPs bactériens FLS2, LYM1, LYM3 et CERK1. A ma connaissance aucune recherche n'a pour l'instant mis en évidence de co-induction de ces récepteurs lors de celle d'autres PRRs, comme cela a par contre été montré pour AtPEPR1 (pour revue : Ryan *et al.*, 2007). En effet, AtPEPR1 est connu comme amplificateur de réponse après reconnaissance de PAMPs par des PRRs. L'étude post-inoculation de ces gènes ne sera donc pas traitée dans la suite de cette discussion.

### 5.4. Répression post-inoculation

Une répression post-inoculation, plus ou moins précoce, est globalement observée chez les trois génotypes de pommier analysés mais elle apparait plus accentuée chez 'Fiesta', notamment pour BAK1, MPK3, MPK6, WAK1bis CEBiP et PEPR1 (Figure 10.B). Ces gènes sont des gènes impliqués dans la transduction du signal ou sont des récepteurs de PAMPs/DAMPs (CEBiP et PEPR1 respectivement ; Jones et Dangl, 2006). La répression de ces gènes peut s'expliquer par le développement d'une ETS faisant rapidement suite à la

---

## Discussion

---

phase de PTI (Jones et Dangl, 2006). Au vu du phénotype fort de résistance observé pour 'Fiesta' 29 jours post-inoculation (Annexe II), on peut raisonnablement supposer qu'une ETI a suivi la PTI et l'ETS chez cette variété. Par contre chez la variété sensible 'Gala', seule la PTI permet théoriquement de freiner l'infection par l'agent pathogène. Ainsi la répression moins visible chez cette variété sensible pourrait s'expliquer par le fait qu'en absence d'autres lignes de défenses la PTI est maintenue le plus possible pour lutter contre l'infection par l'agent pathogène.

### 5.5. Le porte-greffe 'MM106'

L'expression des gènes candidats dans cette étude s'avère plus faible chez 'MM106' que chez 'Fiesta' et 'Gala', avant comme après infection par *V. inequalis* (Figure 10.A). Or 'MM106' est, au final, moins sensible à la souche 104 de tavelure que 'Gala' (Annexe II). Ce résultat semble indiquer qu'indépendamment de la PTI, ou bien qu'à l'aide d'autres gènes de résistance basale que ceux observés dans cette étude, 'MM106' développe dans cette expérimentation des défenses lui permettant de mieux supporter l'attaque par cette souche de tavelure.

### 5.6. Les récepteurs de DAMPs

Le gène WAK1bis testé en qPCR, dont l'expression peut représenter les gènes homologues des AtWAK1-5, s'est révélé tout au long de la cinétique très fortement exprimé chez 'Fiesta' et 'Gala' par rapport à 'MM106' (Figure 10.A). Ce gène est par ailleurs statistiquement significativement induit post-inoculation chez 'MM106' et réprimé chez 'Fiesta' et 'Gala' (Figure 10.B : p-value 0,01). AtWAK1 et AtWAK2 seraient les deux WAKs les plus exprimées dans une grande variété de tissus et, plus généralement, les WAKs seraient induites quelques minutes après une blessure ou quelques heures après une infection bactérienne ou fongique (pour revue : Anderson *et al.*, 2001). Les fragments d'OGs reconnus comme DAMPs par les WAKs sont des produits de la dégradation de la paroi (Henry *et al.*, 2012), première barrière physique rencontrée par le champignon après pénétration. Il est donc possible que pour ce gène-ci, l'observation d'une cinétique d'infection précoce soit adaptée. AtWAK1 est par ailleurs connue pour être réprimée en présence de flg22, comme AtWAK2 (Denoux *et al.*, 2008). Les profils d'expression de WAK1bis dans notre expérimentation pourraient donc être interprétés de la manière suivante : WAK1bis est précocement réprimé par l'ETS chez les deux variétés présentant un niveau d'expression préformé élevé, 'Fiesta' et 'Gala' mais ne l'est pas chez le génotype 'MM106' qui présente un niveau d'expression relativement faible pour ce gène, toujours plus faible que chez les deux autres variétés, même après induction post-inoculation. Autrement dit, les quantités de WAK1bis chez 'MM106' pourraient être suffisamment faibles pour ne pas être ciblées par l'ETS.

Post-inoculation PEPR1 est quant à lui légèrement réprimé chez 'Fiesta' et son expression ne varie globalement pas chez 'Gala' et 'MM106' (Figure 10.B). Ce gène est par ailleurs globalement moins exprimé chez 'Fiesta' que chez 'Gala' et 'MM106', mais de manière non statistiquement significative. Dans le cas de ce récepteur de DAMP il est possible que l'on regarde l'expression trop tôt dans la cinétique d'infection. La plupart des travaux portant sur le sujet analysent l'interaction des protéines récepteurs avec les DAMPs

suite au traitement de cultures cellulaires par des éliciteurs (Yamaguchi *et al.*, 2006 ; Galletti *et al.*, 2008 ; pour revue : Boller et Felix, 2009). Dans ces conditions l'induction des gènes codant pour des PRRs de DAMPs est très rapide, mais elle est potentiellement plus tardive *in planta*. En effet, PEPR1 reconnaît comme DAMP un peptide issu de la dégradation du précurseur protéique PROPEP (pour revue : Boller et Felix, 2009) et dans l'interaction pommier/*V. inequalis*, ce DAMP est peut-être plus tardivement produit que ne peuvent l'être les OGs reconnus par les WAKs. Ils peuvent peut-être même être reconnus seulement une fois qu'a débuté la phase nécrotrophe du champignon, qui n'intervient que tardivement dans l'interaction (pour revue : Bowen *et al.*, 2011). Le fait que PEPR1 soit plus connu comme amplificateur de réponse que comme PRR (pour revue : Ryan *et al.*, 2007) pourrait accréditer cette hypothèse selon laquelle son intervention pourrait être plus tardive dans l'infection.

### **6. PERSPECTIVES**

#### 6.1. Perspectives à court et moyen termes : améliorations techniques

Dans notre étude, le gène GBP n'a pas pu être analysé en qPCR. Les stocks non dilués d'amorces pour ce gène étaient contaminées et le retard engendré par cet incident n'a pas pu être rattrapé par la suite. Il faudra donc répéter pour ce gène les étapes réalisées pour tous les autres dans ce travail.

Les gènes WAK1 et GBPbis se sont avérés trop peu exprimés pour être analysés en qPCR. Les puces oligonucléiques ne sont *a priori* pas plus adaptées pour analyser l'expression de gènes exprimés en très faibles quantités et dont l'expression diffère peu entre les échantillons comparés, ce qui est le cas de ces gènes candidats. Les données obtenues sur les puces pour ces gènes ont été regardées mais les sondes dessinées pour ces gènes étaient pour la plupart aspécifiques et aucune différence significative n'a été observée. La technique de séquençage à haut débit d'ARN ou « RNAseq », peut théoriquement permettre d'amplifier des ARNm peu présents. Cependant, afin d'obtenir une estimation correcte des quantités pour de tels ARNm, une grande profondeur de séquençage serait nécessaire et il faudrait par ailleurs qu'il ne s'agisse pas de gènes de trop petite taille. Les laboratoires Bio-Rad viennent de mettre sur le marché une troisième génération de technologie qPCR : le système QX100 Droplet Digital PCR (ddPCR™). Cette technologie, encore non disponible au laboratoire, promet une détection de l'expression des transcrits plus fine que la qPCR classique, même pour ceux présents en très faible quantité [7].

Concernant les récepteurs de DAMPs il serait intéressant, avant de les analyser dans toute nouvelle étude, de vérifier s'ils sont bien induits de manière précoce suite à l'infection par l'agent pathogène. En effet, cette information manque dans la littérature. On pourrait par exemple les étudier sur une cinétique plus longue. En parallèle des observations microscopiques pourraient être réalisées pour suivre le développement des hyphes infectieux et observer l'impact de leur développement sur l'intégrité de la cellule.

Lorsque l'on analyse l'expression des gènes post-inoculation par rapport à l'expression préformée, l'effet du traitement (pulvérisation) n'est pas pris en compte. Si l'on

---

## Conclusion

---

considère que cet effet n'est pas négligeable, il serait préférable d'établir un témoin en ce sens. Au moment de l'inoculation, un lot de plantes serait pulvérisé avec de l'eau et puis prélevé aux mêmes temps de cinétique que les plantes inoculées. Une fois les valeurs d'expression obtenues pour ces témoins prises en compte dans le calcul des valeurs d'expression post-inoculation, l'analyse de ces dernières par rapport aux données préformées n'engendrerait plus d'erreur quant à l'effet de la pulvérisation.

### 6.2. Perspectives à plus long terme : analyse de la résistance basale chez *V. inaequalis* et *Erwinia amylovora*

Afin de renforcer les résultats de cette étude, il serait intéressant d'inclure plus de variétés sensibles à la tavelure, telles que 'Golden Delicious', 'Pink Lady', ou encore 'Fuji' (Laurens *et al.*, 2004 ; communications personnelles C-E Durel et V. Caffier), mais également partiellement résistantes telles que 'Discovery' et 'Dülmener Rosenapfel' (Laurens *et al.*, 2004). L'idée est que de la sorte on accentuerait les différences entre les deux groupes, appuyant ainsi les hypothèses actuelles. Les deux variétés partiellement résistantes citées sont par ailleurs des variétés travaillées en cartographie dans l'équipe ResPom et pour lesquelles des QRLs sont identifiés (Calenge *et al.*, 2004 ; Soufflet-Freslon *et al.*, 2008).

Effectuer une expérimentation avec une infection par *Erwinia amylovora* permettrait d'étudier post-inoculation les gènes récepteurs de PAMPs bactériens (FLS2, LYM1, LYM3, CERK1) et les gènes de la transduction du signal associée (BAK1, MPK3, MPK6). Il serait intéressant lors de cet essai, de réaliser une inoculation par CFBP1430 (Paulin et Samson, 1973), une souche sauvage d'*E. amylovora*, et en parallèle sur un autre lot de plantes, une inoculation avec une souche mutante déficiente pour son système de sécrétion de type III (TTSS ; Type Three Secretion System). La comparaison de ces deux infections permettrait d'étudier l'effet de l'ETS sur la résistance basale et du coup d'accréditer ou non l'hypothèse selon laquelle, dans notre étude, la répression des gènes de la résistance basale pourrait être due à l'ETS. Dans le cas de *V. inaequalis*, il n'existe pas à ce jour de mutants permettant d'envisager une comparaison du même type.

## **7. CONCLUSION**

Ce travail est une étude prospective dont le but était de trouver, par qPCR chez le pommier, des gènes marqueurs potentiels de la résistance basale, composante de la résistance partielle de certaines variétés. Pour caractériser davantage ces résistances partielles du pommier à la tavelure, le projet ARAMIS propose d'autres approches. Il propose notamment l'analyse, sans *a priori*, des voies métaboliques activées lors d'une infection, via une étude transcriptomique, et de manière simultanée, l'analyse de l'effet de l'activation de ces voies métaboliques sur les composantes de l'agressivité du champignon. L'objectif à long terme est d'améliorer les variétés de pommier en combinant des QRLs aux mécanismes d'action complémentaires. L'hypothèse étant que les résistances partielles ainsi créées, à large spectre d'hôte et plus difficilement contournables par les agents pathogènes que les résistances monogéniques actuellement utilisées, seraient plus durables. Cependant, les variétés à

## Conclusion

---

résistance partielle ainsi produites ne resteront elle-même efficaces qu'avec une stratégie intégrative de gestion de la culture.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson, C. M., Wagner, T. A., Perret, M., He, Z. H., He, D., et Kohorn, B. D. (2001). WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Molecular Biology*, *47*, 197–206.
- Antolín-Llovera, M., Ried, M. K., Binder, A., et Parniske, M. (2012). Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *50*, 451–73.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., et Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, *415*, 977–983.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., et Pugin, A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *16*, 1118–1128.
- Bénaouf, G., et Parisi, L. (2000). Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology*, *90*, 236–242.
- Bittel, P., et Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*, 335–341.
- Boller, T., et Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, *60*, 379–406.
- Brun, L., Didelot, F., et Parisi, L. (2008). Effects of apple cultivar susceptibility to *Venturia inaequalis* on scab epidemics in apple orchards. *Crop Protection*, *27*, 1009–1019.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., et Lorenzo, G. De. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *PNAS*, *107*, 9452–9457.
- Calenge, F., Faure, A., Goerre, M., Gebhardt, C., Van de Weg, W. E., Parisi, L., et Durel, C.-E. (2004). Quantitative Trait Loci (QTL) Analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, *94*, 370–379.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., De Vries, S., et Kemmerling, B. (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science*, *14*, 535–541.
- Danna, C. H., Millet, Y. A., Koller, T., Han, S., Bent, A. F., Ronald, P. C., et Ausubel, F. M. (2011). The Arabidopsis flagellin receptor FLS2 mediates the perception of Xanthomonas Ax21 secreted peptides. *PNAS*, *108*, 9286–9291.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F. M., et Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant*, *1*, 423–445.
- Dodds, P. N., et Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*, 539–548.
- Durel, C.-E., Parisi, L., Laurens, F., Van De Weg, W. E., Liebhard, R., et Jourjon, M. F. (2003). Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome*, *234*, 224–234.
- Durel, C., Laurens, F., Caffier, V., Cam, B. Le, et Sapoukhina, N. (2007). Les apports de l'innovation variétale: Recherches menées pour améliorer la résistance du pommier à la tavelure. *Colloque Protection Intégrée en Arboriculture et Viticulture, Paris, 22 Novembre 2007*, 45–60.
- Eulgem, T., et Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*, 366–371.



## Références bibliographiques

---

- Faulkner, C., et Robatzek, S. (2012). Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 699–707.
- Fliegmann, J., Mithofer, A., Wanner, G., et Ebel, J. (2004). An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 1132–1140.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275–296.
- Fulton, T. M., Chunzoongse, J., Tanksley, S. D., Breeding, P., et Hall, E. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 207–209.
- Galletti, R., Ferrari, S., et De Lorenzo, G. (2011). Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 157, 804–814.
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., Zhang, Y. (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research*, 18, 1190–1198
- Gessler, C., et Stumm, D. (1983). Infection and stroma formation by *Venturia inaequalis* on apple leaves with different degrees of susceptibility to scab. *Journal of Phytopathology*, 110, 119–126.
- Gibson, G. et Muse, S.V. (2004). Le séquençage des génomes. In : Précis de Génomique, De Boek et Larcier, De Boek Université, Bruxelles, 86–87.
- Gómez-Gómez, L., et Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7, 251–256.
- Greenberg, J. T., et Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6, 201–211.
- Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 315–319.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., et Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8, 1–14.
- Henry, G., Thonart, P., et Ongena, M. (2012). PAMPs , MAMPs , DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16, 257–268.
- Hough, L.F. (1944). A survey of the scab resistance of the foliage on seedlings in selected apple progenies. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 44, 260–271
- Hückelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 101–127.
- Huffaker, A., Dafoe, N. J., et Schmelz, E. A. (2011). ZmPep1, an ortholog of Arabidopsis elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. *Plant Physiology*, 155, 1325–1338.
- Jones, J. D. G., et Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329.
- Journot-Catalino, N., Somssich, I. E., Roby, D., et Kroj, T. (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 18, 3289–3302.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., et Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 11086–11091.



## Références bibliographiques

---

- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K. A. S., Becker, D., et Hedrich, R. (2010). Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 13471–13479.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., et Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16, 3496–3507.
- Laurens, F., Chevalier, M., Dolega, E., Gennari, F., Goerre, M., Fischer, C., Kellerhals, M., Lateur, M., Lefrancq, B., Parisi, L., Schouten, H. J., et Tartarini, S. (2004). Local european cultivars as sources of durable scab resistance in apple. *Acta Horticulturae*, 663, 115–121.
- Lauri, P.-E., Simon, S., Brun, L., Morel, K., Combe, F., Defrance, H., Hemptinne, J.-L., Hucbourg, B., Regnard, J.-L. (2011). Le pommier et ses bioagresseurs – Les composantes dynamique et structurelle de l’architecture de l’arbre modulent les dynamiques d’infestation et d’infection. *Innovations Agronomiques*, 15, 65–77.
- Lotze, M. T., Deisseroth, A., et Rubartelli, A. (2007). Damage associated molecular pattern molecules. *Clinical Immunology*, 124, 1–4.
- Mishra, N. S., Tuteja, R., et Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452, 55–68.
- Monaghan, J., et Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 349–57.
- Mysore, K. S., et Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9, 97–104.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., et Hirt, H. (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science*, 10, 339–346.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., et Jones, J. D. G. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22 interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology*, 135, 1113–1128.
- Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y., et Shibuya, N. (2002). High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor. *Plant Cell Physiology*, 43, 505–512.
- Oliver, R. P., et Ipcho, S. V. S. (2004). *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 5, 347-352.
- Paulin, J.P., et Samson, R. (1973). Le feu bactérien en France II. Caractères des souches d’*Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al. 1920, isolées du foyer franco-belge. *Annual Review of Phytopathology*, 5, 389-397.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2003-2007.
- Pitzschke, A., Schikora, A., et Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 421–426.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F. G., Tör, M., de Vries, S., et Zipfel, C. (2011). The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*, 23, 2440–2455.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. et Shen, Q.J. (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15, 247–258.
-

## Références bibliographiques

---

- R Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Ryan, C. a, Huffaker, A., et Yamaguchi, Y. (2007). New insights into innate immunity in Arabidopsis. *Cellular Microbiology*, 9, 1902–1908.
- Schwessinger, B., et Ronald, P. C. (2012). Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 451–482.
- Segonzac, C., et Zipfel, C. (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 54–61.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., et Shibuya, N. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 64, 204–214.
- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H., et Shibuya, N. (2012). Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in Arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. *Plant Cell Physiology*, 53, 1696–1706.
- Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Dow, J. M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., Newman, M-A., et Molinaro, A. (2010). Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*, 20, 406–419.
- Soufflet-Freslon, V., Gianfranceschi, L., Patocchi, A., et Durel, C-E. (2008). Inheritance studies of apple scab resistance and identification of Rvi14, a new major gene that acts together with other broadspectrum QTL. *Genome*, 51, 657–667.
- Suzuki, R., et Shimodaira, H. (2006). Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22, 1540–1542.
- Takai, R., Isogai, A., Takayama, S., et Che, F. (2008). Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 1635–1642.
- Tanaka, S., Ichikawa, A., Yamada, K., Tsuji, G., Nishiuchi, T., Mori, M., Koga, H., Nishizawa, Y., O'Connell, R., et Kubo, Y. (2010). HvCEBiP, a gene homologous to rice chitin receptor CEBiP, contributes to basal resistance of barley to *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology*, 10, 1–11.
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., et Joosten, M. H. A. J. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23, 4–15.
- Trillot, M., Masseron, A., Mathieu, V., Bergougnoux, F., Hutin, C. et Lespinasse, Y. (2002). Le pommier, C.T.I.F.L., Paris, 287 p.
- Uma, B., Rani, T. S., et Podile, A. R. (2011). Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2141–2152.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., et Ishida, I. (1997). The structure and function of a soybean b-glucan-elicitor-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1029–1034.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 1–12.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S.,

## Références bibliographiques

---

- Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchiotti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagné, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouzé, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm M., Van de Peer, Y., Salamini, F. et Viola, R., 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42, 833–839
- Vergne, E. (2007). Analyse des systèmes inductibles et préformés de défense du riz à *Magnaporthe oryzae* au travers de l'expression de gènes. Thèse en biologie intégrative des plantes, Université Montpellier II, Montpellier, 273 p.
- Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Nottéghem, J.-L., et Morel, J-B (2010). Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology*, 10, 1-17.
- Warnes, G. R. (2012). Includes R source code and/or documentation contributed by: Ben Bolker, Lodewijk Bonebakker, Robert Gentleman, Wolfgang Huber Andy Liaw, Thomas Lumley, Martin Maechler, Arni Magnusson, Steffen Moeller, Marc Schwartz and Bill Venables (2011). gplots: Various R programming tools for plotting data. R package version 2.10. 1.
- Willmann, R., Lajunen, H. M., Erbs, G., Newman, M., Kolb, D., et Tsuda, K. (2011). Mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *PNAS*, 108, 19824–19829.
- Yamaguchi, Y., Pearce, G., Ryan, C.A. (2006). The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 10104–10109.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A. C., Tax, F. E., et Ryan, C. A. (2010). PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22, 508–522.
- Yamaguchi, Y., et Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 351–357.
- Yang, X., Deng, F., et Ramonell, K. M. (2012). Receptor-like kinases and receptor-like proteins: keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Frontiers in Biology*, 7, 155–166.
- Zhang, Y., Lubberstedt, T., et Xu, M. (2013). The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics*, 40, 23–35.
- Zheng, Z., Qamar, S.A., Chen, Z., Mengiste, T. (2006). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant Journal*, 48, 592–605
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., et Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, 428, 764–767.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 414–420.

### SITOGRAPHIE

Ouvrages en ligne :

INRA, 2012

Rapport d'activité annuel

[En ligne] INRA (consulté le 20/08/13)

Disponible sur :

<http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/239082-48f45-resource-rapport-d-activite-2012.html>

INRA Dossier de presse, 2013

La recherche végétale. Quand l'union fait la force

[En ligne] INRA (consulté le 27/08/13)

Disponible sur :

<http://inra.dam.front.pad.brainsonic.com/ressources/afile/231517-9601f-resource-dossier-de-presse-irhs.html>

Pages internet :

[1] INRA

<http://institut.inra.fr/Reperes/Jalons-historiques>

[Consulté le 20/08/13]

[2] IRHS

<http://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs/Recherche>

[Consulté le 14/03/13]

[3] IRHS

<http://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs>

[Consulté le 20/08/13]

[4] IRHS

<http://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs/Recherche/ResPom>

[Consulté le 20/08/13]

[5] La pomme

<http://www.lapomme.org/chiffres/consomation.htm>

[Consulté le 20/08/13]

[6] Portail des produits phytopharmaceutiques

<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>

[Consulté le 16/04/13]

[7] Bio-Rad

<http://www.bio-rad.com/en-us/product/digital-pcr-technology/qx100-droplet-digital-pcr-system>

[Consulté le 28/08/13]

# ANNEXES

## Annexes

---

**Annexe I.** Scripts R utilisés pour établir les heatmaps et les dendrogrammes associés, et le test Kruskal Wallis

### Heatmaps et dendrogrammes:

```
library(gplots)
library(pvclust)

a<-read.delim("Gene.txt", header=T, row.names=1)
CSC<-rainbow(nlevels(a[,1]))
CSC.2<-sapply(1:length(a[,1]), function(x){
tmp<-which(levels(a[,1])==a[x,1])
CSC[tmp]})

heatmap.2(as.matrix(t(a[,-1])),
distfun=function(x)dist(x, method="euclidean"),
hclustfun=function(x)hclust(x, method="complete"),
trace="none",
col=cm.colors,
symbreaks=T,
margin=c(5,14),
ColSideColors=CSC.2,
Roww=as.dendrogram(hclust(as.dist(1-cor(as.matrix(a[,-1])))))
legend(0.75,1, pch=22, pt.bg=CSC, levels(a[,1]), cex=0.6, bty="n")

par(mfrow=c(1,2))
plot(hclust(as.dist(1-cor(as.matrix(a[,-1]))), method="complete"))

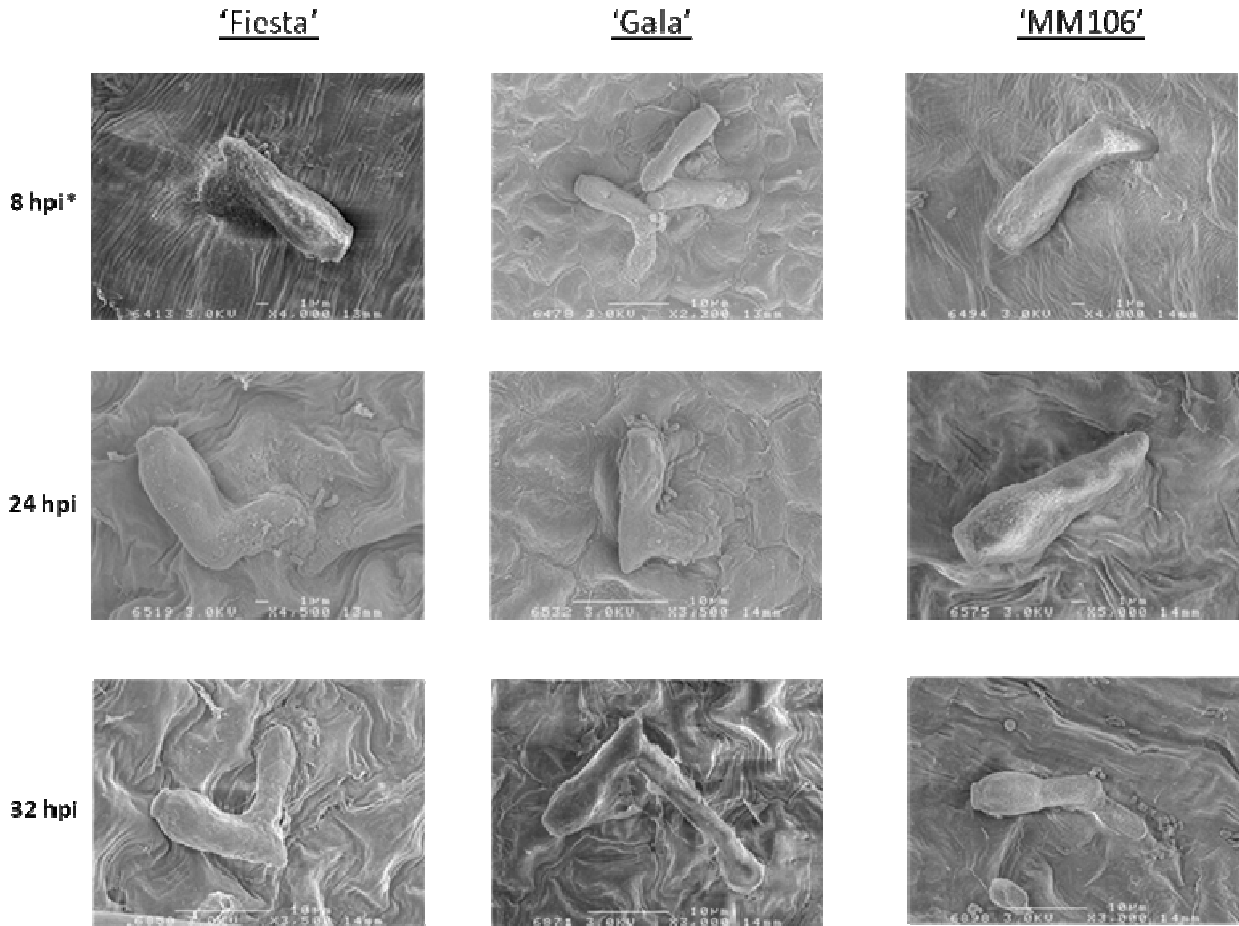
resulta <- pvclust(a[,2:7], method.dist="cor", method.hclust="complete", nboot=10000)
plot(resulta, main="Dendrogram with means")
pvrect(resulta, alpha=0.95)
```

### Test Kruskal Wallis :

```
data <- read.delim('Fichier.txt', h=T)
library (agricolae)
compare<-kruskal(data$NRQGene,data$Modalite,group=T)
```

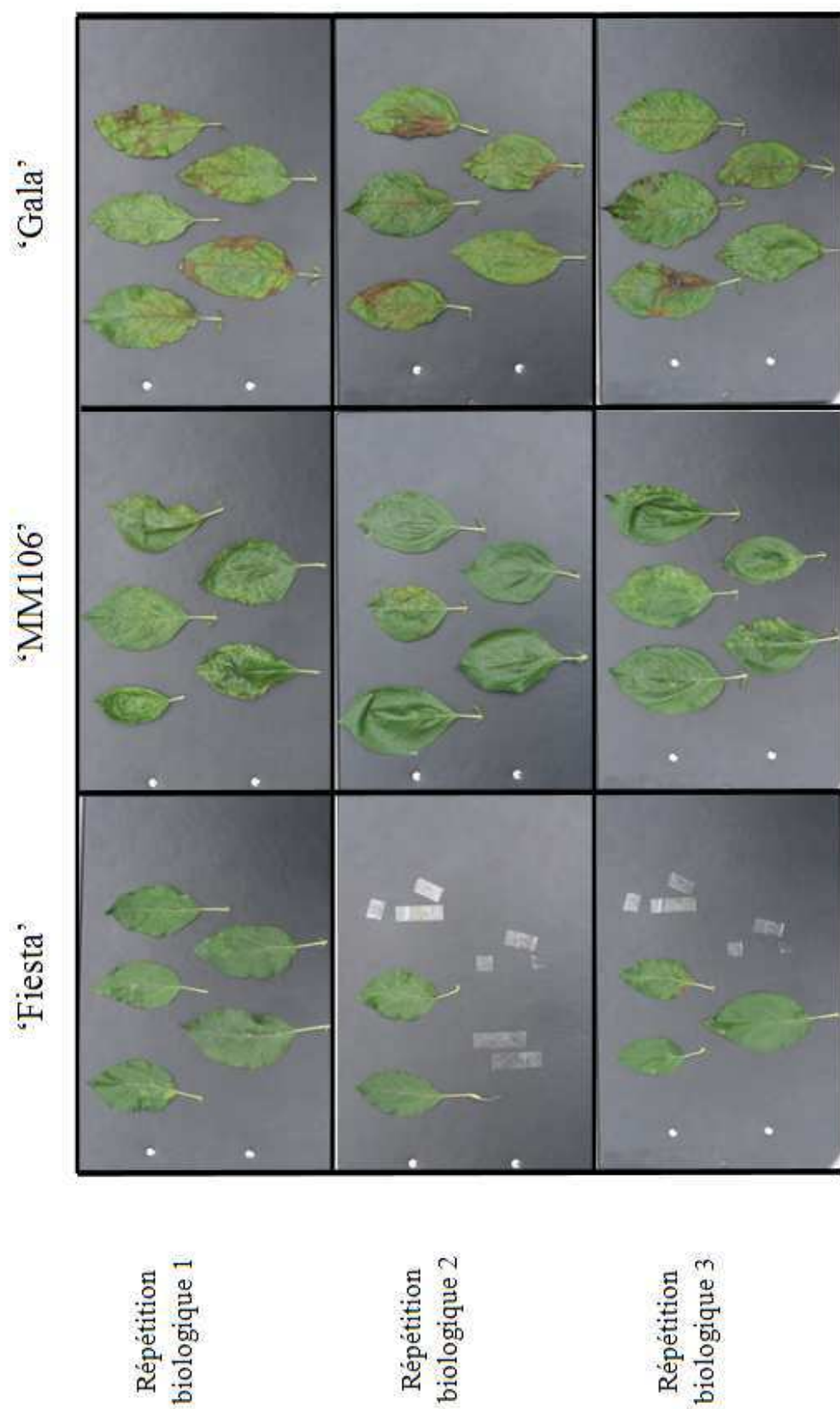
## Annexes

**Annexe II.** Observations microscopiques à balayage électronique de la germination des spores de la souche 104 de *V. inaequalis* sur les variétés 'Fiesta', 'Gala' et 'MM106' de *Malus x domestica* Borkh., 8h, 24h et 32h après inoculation (Photographies E. Vergne-Gaillard, 2011).





**Annexe III.** Observations phénotypiques des trois génotypes ‘Fiesta’, ‘MM106’ et ‘Gala’ 29 jours après inoculation de *V. inaequalis*, en fonction des répétitions biologiques (Photographies E. Vergne-Gaillard, 2011).



## RESUME

La pomme est le fruit le plus produit et consommé en France. Du fait de cet enjeu économique fort, il est important de réduire l'utilisation de produits phytosanitaires, sur cette production sans en impacter le rendement. La création variétale cherche à produire aujourd'hui des variétés à résistance durable, en combinant pour cela des résistances partielles. Il s'agit de résistances quantitatives et à large spectre d'hôte dans lesquelles la résistance basale est la première ligne de défense inductible. Toutefois, les mécanismes sous-jacents sont très peu connus. A travers l'analyse de l'expression de gènes du pommier, sélectionnés pour être potentiellement impliqués dans la résistance basale, l'objectif a été d'étudier une telle résistance chez la variété partiellement résistante à la tavelure 'Fiesta' par rapport à la variété sensible 'Gala' et au porte-greffe 'MM106'. L'analyse de l'expression des gènes FLS2, LYM1, LYM3, CERK1, CEBiP, WAK1, PEPR1, BAK1, MPK3 et MPK6 montre qu'ils sont en majorité plus exprimés avant infection chez 'Fiesta' que chez 'Gala'. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse vérifiée pour le pathosystème riz/*Magnaporthe grisea* et selon laquelle l'expression préformée des gènes impliqués dans la résistance est globalement plus élevée chez les variétés à résistance partielle par rapport aux variétés sensibles. De plus, l'analyse de l'expression des gènes CEBiP, WAK1, PEPR1, BAK1, MPK3 et MPK6 post-inoculation par *Venturia inaequalis* nous a également permis de constater une répression globale de ces gènes chez les trois génotypes. Ce résultat pourrait indiquer que des effecteurs de *Venturia inaequalis* ciblent et répriment les gènes impliqués dans la résistance basale du pommier afin de favoriser l'infection.

**Mots clés :** Pommier, *Venturia inaequalis*, Résistance basale, expression préformée, expression post-inoculation, qPCR.

## ABSTRACT

Apple is the first fruit in France in terms of production as well as consumption. Because of its strong economic impact, it is important to reduce pesticides while maintaining high productivity on apple. Therefore, current breeding programs aim to create varieties with more durable resistance, by combining partial resistances. These are quantitative and broad-spectrum resistances in which basal resistance is the first line of inducible defense. However, the mechanisms underlying basal resistance are often unknown. Through analysis of the expression of apple genes potentially involved in basal resistance, the aim was to study a such resistance in the 'Fiesta' variety, partially resistant to scab, compared to the 'Gala' variety, sensitive, and to the rootstock 'MM106'. Expression analysis of FLS2, LYM1, LYM3, CERK1, CEBiP, WAK1, PEPR1, BAK1, MPK3 and MPK6 has revealed higher expression in 'Fiesta' than in 'Gala' for the majority of these genes. This result is consistent with the hypothesis checked in rice/*Magnaporthe grisea* pathosystem that preformed expression of defense genes is globally stronger in partial resistant variety than in sensitive ones. Moreover, analysis of *Venturia inaequalis* post-inoculation expression of CEBiP, WAK1, PEPR1, BAK1, MPK3 and MPK6 showed a global repression of these genes in the three genotypes. This result seems to indicate that some effectors of *Venturia inaequalis* targets and repressed basal resistance genes in apple to favor the infection.

**Key words:** Apple, *Venturia inaequalis*, Basal resistance, Preformed expression, Post-inoculation expression, qPCR.