



HAL
open science

Étude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et d'efficacité des stimulateurs de défense des plantes

Camille Pubert

► To cite this version:

Camille Pubert. Étude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et d'efficacité des stimulateurs de défense des plantes. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02410001

HAL Id: dumas-02410001

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02410001v1>

Submitted on 13 Dec 2019

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

CFR Rennes



Année universitaire : 2018- 2019

Spécialité :

Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

Science et ingénierie du végétal
(Semences et plants : recherche et
développement, production,
commercialisation)

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et d'efficacité des stimulateurs de défense des plantes

Par : Camille PUBERT



Soutenu à Angers le 17 septembre 2019

Devant le jury composé de :

Président : Olivier Leprince

Maître de stage : Laure Perchepped

Enseignant référent : Valérie Le Clerc

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Muriel Marchi, Ingénieur de recherche

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

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Charles-Eric Duel, Laure Percherpied et Juliette Benejam de m'avoir permis de réaliser ce stage mais également de m'avoir soutenue et apporté leur conseil pour mes candidatures de thèse.

Je remercie Laure Percherpied, mon maître de stage, et Juliette Benejam pour leur présence et leurs explications tout au long du stage, pour leur relecture des parties de ce mémoire, pour leur conseil, pour leur écoute et pour la confiance qu'elles m'ont accordée.

Je remercie Elisa Ravon, pour ses conseils lors des manipulations en biologie moléculaire.

Je remercie Marie-Noëlle Brisset et Matthieu Gaucher pour leur explication de la méthode de calcul de l'expression relative qui m'a permis de mieux comprendre tous les calculs présents derrière la « macro ».

Je remercie Hélène Muranty pour sa présence pour répondre à nos hésitations sur les analyses statistiques et pour son explication des analyses de génétique d'association.

De manière générale, je tiens à remercier toute l'équipe ResPom pour leur accueil et leur bienveillance durant ce stage

Pour finir, je tiens à remercier toutes les personnes de mon entourage qui m'ont soutenu tout au long de ces quatre années à Agrocampus et lors de la rédaction de ce mémoire.

Encore merci à vous tous.

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et efficacité des stimulateurs de défense des plantes

Table des matières

Remerciements.....	I
Table des matières.....	III
Liste des abréviations.....	V
Glossaire.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
1. Introduction.....	1
1.1- Contexte de la pomme.....	1
1.2- Les bioagresseurs du pommier.....	1
1.2-1. Feu bactérien (<i>Erwinia amylovora</i>).....	1
1.2-2. Tavelure (<i>Venturia inaequalis</i>).....	2
1.3- Les défenses des plantes.....	3
1.3-1. Résistance qualitative et résistance quantitative.....	3
1.3-2. Défenses constitutives et induites.....	4
1.3-3. Stimulateur de défense des plantes.....	5
1.4- Le projet PREDIRE.....	5
2. Matériel et Méthodes.....	6
2.1- Matériel végétal.....	6
2.2- Phénotypage.....	7
2.2-1. Feu bactérien.....	7
2.2-2. Tavelure.....	7
2.3- Expressions constitutives.....	8
2.3-1. Extraction et transcription inverse.....	9
2.3-2. Sélection des gènes et dessin des amorces.....	9
2.3-3. Expression des gènes.....	10
2.4- Analyses statistiques.....	11
2.4-1. Analyses de l'expression constitutive.....	11
2.4-2. Analyses du phénotypage avec le stimulateur de défense des plantes.....	12
2.4-3. Corrélation entre l'expression et le phénotype de la Core Collection.....	12
3. Résultats.....	13
3.1- Analyse de la variabilité d'expression constitutive des gènes de la population A et de l'efficacité du Bion®.....	13
3.1-1. Phénotype de résistance au feu bactérien et à la tavelure de la population A avec l'application de Bion®.....	13
3.1-2. Expression constitutive des gènes de défenses de la population A.....	15

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et efficacité des stimulateurs de défense des plantes

3.1-3. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes de défenses de la population A et l'efficacité du Bion®.....	17
3.1-4. Validation du travail de design des amorces.....	17
3.2- Analyse de l'expression constitutive des gènes de défenses de la population B avec le niveau de résistance aux bioagresseurs.....	19
3.2-1. Expression constitutive des gènes de défenses sur la population B.....	19
3.2-2. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes de défenses de la population B avec le niveau de résistance aux bioagresseurs.....	21
4. Discussion.....	21
4.1- Variabilité du niveau de résistance après application de Bion®.....	21
4.2- Variabilité du niveau d'expression constitutive d'un panel de gènes de défenses....	22
4.3- Corrélation entre les niveaux de résistance, d'efficacité du Bion® et d'expression constitutive de gènes de défenses.....	23
4.3-1. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et l'efficacité du Bion®	23
4.3-2. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et la résistance au feu bactérien et à la tavelure.....	24
5. Conclusion et perspectives.....	24
Bibliographie.....	26
Liste bibliographique.....	26
Liste sitographique.....	28
Annexes.....	I
Annexe I : Numéro d'accèsion et nom des génotypes du sous-échantillon, de l'extension et des témoins des tests.....	I
Annexe II : Protocole d'extraction d'ARN.....	II
Annexe III : Protocole de transcription inverse et PCR de vérification.....	III
Annexe IV : arbre phylogénétique de la famille Bet v1, Mal d1 (PR-10).....	V
Annexe V : Protocole de test des amorces.....	VI
Annexe VI : tableau récapitulatif complet des gènes étudiés.....	VIII
Annexe VII : Graphiques des tests de résistances à la tavelure (2017) et au feu bactérien (2018) et corrélation avec l'expression constitutive des gènes d'intérêt.....	IX
Annexe VIII : Graphiques de variabilité des autres gènes d'intérêt sur la population A.....	X
Annexe IX : Graphiques de variabilité des autres gènes d'intérêt sur la population B....	XI

Liste des abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

Agg : Agglutinine

APOX : Ascorbate peroxidase

ARN : Acide ribonucléique

ANOVA : Analyse de la variance

AUDPC Area Under the Disease progress curve (aire sous la courbe de progression de la maladie)

Bidefi : Bioinformatics for plant Defense Investigation

CAD : Cinnamyl alcool dehydrogenase

CalS : Callose synthase

CC : Core collection

CSL : Cystéine lyase

FPPS : Farnesyl pyrophosphate synthase

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GWAS : Genome wide association study (étude de génétique d'association)

HMGR : Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase

IFT : Indicateur de fréquence de traitement

IRHS : Institut de Recherche en Horticulture et Semences

NN : Nécrose Nervure

NNP : Nécrose Nervure Pétiole

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de la polymérase)

PPO : Polyphenol oxidase

PR8 : Classe III chitinase

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne quantitative de la polymérase)

ResPom : Résistance du pommier et du poirier aux bioagresseurs

RT : Reverse transcriptase (transcription inversée)

SDN : Stimulateurs de défenses naturelles

SDP : Stimulateurs de défenses des plantes

SNP : Single nucleotide polymorphism (polymorphisme nucléotidique)

TuA : Tubuline alpha chaîne

UMR : Unité Mixte de Recherche

ZNP : Zone non polymorphe

Glossaire

IFT : « Pour un traitement appliqué sur toute la parcelle, l'indicateur de fréquence de traitement (IFT) est le ratio entre la dose employée et la dose de référence du produit utilisé. La méthodologie de calcul des IFT a été revue en 2015, notamment afin de tenir compte des cibles dans le calcul des doses de références. Les IFT calculés et présentés dans ce dossier pour 2012 et 2015 se fondent sur cette nouvelle méthodologie. » (Cretin and Triquenot, 2018)

Core collection : Collection de variété formée d'un nombre réduit d'échantillons uniques et représentatifs de la diversité existante (Mission communication INRA, 2013)

Bioagresseur : « Le terme bioagresseur regroupe tous les organismes pouvant engendrer des dommages sur les cultures. Il peut s'agir d'agents pathogènes responsables de maladies, de ravageurs ou de plantes adventices. » (EcophytoPIC, n.d.)

Produits phytopharmaceutiques : Il s'agit de substances actives ou de préparations contenant une ou des substances actives qui sont destinées à la protection des végétaux ou des produits végétaux contre tous les organismes nuisibles, à exercer une action sur les processus vitaux des végétaux ou à la destruction de végétaux indésirables. Sont inclus dans cette définition les produits issus de synthèse chimique, les produits d'origine naturelle et les micro-organismes. (Ecophyto Pro, 2017)

Organisme de quarantaine : « Organisme nuisible qui a une importance potentielle pour l'économie de la zone menacée et qui n'est pas encore présent dans cette zone, ou bien qui y est présent, mais à distribution restreinte, et faisant l'objet d'une lutte officielle » (FAO, 1995)

Liste des figures

Figure 1 : A gauche, photo d'exsudats de la bactérie <i>Erwinia amylovora</i> avec le développement d'une nécrose de la nervure sur plant de pommier (source : photo personnelle) et à droite, photo de plants de pommier infectés par la bactérie avec le symptôme caractéristique de brûlure de la pousse (source : photo personnelle)	2
Figure 2 : Cycle de développement du champignon <i>Venturia inaequalis</i> (Bowen et al., 2011) 3	3
Figure 3 : Schéma représentatif des réactions de la résistance qualitative (à gauche) et de la résistance quantitative (à droite) (Roby and Raffaele, 2016).....	4
Figure 4 : Echelle de notation des symptômes de réaction d'après Chevalier et al., 1991	8
Figure 5 : Echelle de notation de l'importance de la sporulation par pourcentage de couverture de la feuille (document adapté de la version de Croxall et al., 1952)	8
Figure 6: Tableau récapitulatif des prélèvements de répliquas biologiques en fonction des dates de prélèvement (source : Elisa Ravon).....	9
Figure 7 : Graphique de l'AUDPC du ratio longueur de nécrose sur longueur total du test feu bactérien (2019) avec l'application de la modalité eau (bleu), avec l'application du Bion® à 0,4g/L (jaune) et la différence Eau-Bion® (vert).....	14
Figure 8 : Graphique de l'AUDPC de la sporulation du test tavelure (2018) avec l'application de la modalité eau (bleu), l'application de la modalité Bion® 0,2g/L (jaune) et la différence Eau-Bion® (vert).....	14
Figure 9 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène APOX ($\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$) pour les génotypes du sous-échantillon.....	15
Figure 10 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène CSL ($\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$) pour les génotypes du sous-échantillon.....	16
Figure 11 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène Agg ($\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$) pour les génotypes du sous-échantillon.....	16
Figure 12 : Alignements des amorces de la qPFD pour PR10 avec la séquence du gène ciblé et la séquence ciblée avec les zones non polymorphes	18
Figure 13 : Alignements des amorces désignées 2 et 3 pour PR10 avec la séquence du gène ciblé et la séquence ciblée avec les zones non polymorphes	19
Figure 14 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène APOX ($\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$) pour les génotypes du sous-échantillon plus l'extension.....	19
Figure 15 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène CSL ($\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$) pour les génotypes du sous-échantillon plus l'extension	20
Figure 16 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène Agg ($\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$) pour les génotypes du sous-échantillon plus l'extension	20

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des gènes de défenses validés pour les analyses (activités tirées de l'article Marolleau et al., 2013).....	10
Tableau 2 : Récapitulatif des résultats d'analyse de l'expression des gènes (sous-échantillon).....	17
Tableau 3 : Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et la résistance au feu bactérien et à la tavelure avec l'utilisation du Bion®	17
Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques des amorces testées pour le gène d'intérêt PR10	18
Tableau 5 : Récapitulatif des résultats d'analyse de l'expression des gènes (sous-échantillon + extension)	21
Tableau 6 : Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et la résistance au feu bactérien et à la tavelure.....	21

1. Introduction

1.1- Contexte de la pomme

La pomme est l'un des fruits le plus consommé et produit au monde avec 89,3 millions de tonnes en 2016. La même année, la consommation moyenne par personne et par an était de 12,2 kg. La Chine est le premier producteur (44,4 millions de tonnes) mais également le plus important consommateur puisque 48% du marché est consommé dans le pays (AgriOrbit, 2018).

En France, c'est également une culture très importante avec une production de 1,44 millions de tonnes en 2018. Elle représente plus de la moitié des fruits frais produits dans le pays. Il existe un grand nombre de variétés cultivées. Les plus importantes et les plus connues sont Golden et Gala. Dans la consommation des ménages, elles correspondent à la moitié des achats avec 28% du volume acheté pour Golden et 22% pour Gala. Depuis quelques années, la consommation de pommes est en légère hausse et d'autres variétés, Pink Lady® et Ariane, font une progression intéressante (Agreste, 2019; FranceAgriMer, 2019, 2017)

Cette augmentation est visible sur l'ensemble des fruits frais. Elle s'explique notamment avec la volonté de plus en plus présente de mieux manger. Une grande partie de la population reconnaît leurs bienfaits sur la santé cependant il y a de plus en plus de problématiques par rapport à leur production. Les pratiques agricoles et surtout l'utilisation des produits phytopharmaceutiques fait débat. En 2015, la pomme est le fruit le plus traité avec en moyenne 36 traitements et un IFT moyen de 33,3. Il s'agit pour 63% de traitements fongiques. (Cretin and Triquenot, 2018).

Avec la politique actuelle, un changement de méthode est nécessaire pour répondre aux nouvelles attentes et apaiser les inquiétudes. Le plan Ecophyto II pose une trame de travail pour arriver à une agriculture plus durable. Il fixe notamment les objectifs de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques, de 25% en 2020 et 50% en 2025. Pour se faire, des travaux sur l'identification, la documentation, la diffusion et la valorisation des alternatives doivent être engagés (Ministère de la Transition écologique et solidaire, 2018). Les interprofessions des fruits et légumes frais en font donc l'un des points importants dans le plan de la filière « Réduire sur base scientifique l'usage des pesticides et renforcer les démarches de bio-contrôle » (Interfel and Anifelt, 2017). La transition vers une agriculture à bas niveau d'intrants passe par le travail de recherche et de développement des centres techniques tel que le CTIFL, des chambres d'agriculture, et des centres de recherches tels que l'INRA.

1.2- Les bioagresseurs du pommier

Si la filière pomme consomme autant de produits phytopharmaceutiques, c'est qu'il existe un certain nombre de maladies et ravageurs ayant un impact sur les arbres ou bien sur la production qui entraînent une diminution des rendements ou de la qualité des fruits pour la commercialisation. Pour les ravageurs, nous pouvons citer plusieurs cochenilles qui colonisent les rameaux, mais également des pucerons avec le puceron vert migrant ou non migrant et le puceron cendré qui s'attaquent aux feuilles ou encore le carpocapse qui fait des dégâts sur les fruits. Ensuite les virus sont assez bien contrôlés avec l'utilisation de plants certifiés. Les maladies fongiques les plus fréquentes sont l'oïdium et surtout la tavelure que nous verrons plus en détail après. Mais pour commencer intéressons-nous plus particulièrement à l'une des maladies bactériennes la plus redoutée, le feu bactérien (INRA, 2018).

1.2-1. Feu bactérien (*Erwinia amylovora*)

Le feu bactérien est une maladie qui touche principalement les Maloïdées une sous-famille des Rosacées. Elle est dû à une bactérie appelée *Erwinia amylovora*. Du fait de l'importance des

dégâts qu'elle provoque sur pommier et poirier, elle a été placée sur la liste A2 par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP/EPPO, 2018). Elle doit de ce fait être traitée comme un organisme de quarantaine car elle peut engendrer une réduction importante du rendement voire la perte totale de celui-ci. Ce qui signifie que sa lutte est obligatoire « en tout lieu et en tout temps » pour empêcher sa propagation (FREDON PACA, 2018).

Pour ce qui est de son cycle de développement, la bactérie passe l'hiver dans les chancres qu'elle a formés au niveau de l'écorce des arbres. Ils serviront d'inoculum primaire arrivés au printemps. Sa dissémination passe par la production d'exsudats orange (figure 1, photo de gauche) qui vont être transportés et infecter d'autres plants par le biais des éclaboussures, du vent, des animaux (oiseaux et insectes) et de l'homme. La pénétration dans la plante se fait par les fleurs, les ouvertures naturelles et les plaies puis la bactérie va progresser dans la plante par les vaisseaux (Brisset, 2016; de Bernonville, 2009; OEPP/EPPO, n.d.)



Figure 1 : A gauche, photo d'exsudats de la bactérie *Erwinia amylovora* avec le développement d'une nécrose de la nervure sur plant de pommier (source : photo personnelle) et à droite, photo de plants de pommier infectés par la bactérie avec le symptôme caractéristique de brûlure de la pousse (source : photo personnelle)

Les symptômes de la maladie sont visibles sur les jeunes pousses et rameaux (figure 1, photo de droite), les feuilles, les fleurs et les fruits. Ces différents organes de la plante se nécrosent et arborent un aspect brûlé ce qui a donné son nom à la maladie. Les premiers symptômes sont visibles dès le début du printemps si le temps est humide et chaud (OEPP/EPPO, 2013).

Il n'existe pas actuellement de produit phytopharmaceutique efficace contre cette maladie. La prophylaxie (choix des variétés, contrôle visuel, désinfection des outils,...) et l'assainissement des parties infectées voire l'arrachage des plants puis leur incinération sont les seuls moyens de la prévenir ou la contenir (FREDON PACA, 2018; GIE-FPSO, 2014).

1.2-2. Tavelure (*Venturia inaequalis*)

La maladie de la tavelure est causée par le champignon ascomycète appelé *Venturia inaequalis*. Ce type de champignon se caractérise par la production d'asques, une structure de reproduction en forme de sac. Son cycle de développement est représenté sur la figure 2. A l'automne il se reproduit sexuellement à l'intérieur des feuilles pour former des pseudothèces. C'est sous cette forme que le champignon passe l'hiver dans la litière de feuilles aux pieds des arbres. Au printemps des ascospores sont libérées et vont être disséminées par l'eau et le vent. Elles vont infecter les jeunes feuilles en pénétrant sous la cuticule. Après plusieurs semaines de développement du mycélium, des conidies sont produites et vont pouvoir à leur tour infecter de

nouveaux organes et recommencer à se développer et produire de nouvelles conidies (Didelot et al., 2018; Bowen et al., 2011; Carisse et al., 2006).

Des symptômes sont observables sur les feuilles avec l'apparition de taches de couleur marron arborant un aspect duveteux qui correspond à la sporulation du champignon. Les fleurs peuvent elles aussi présenter des taches qui entraineront leur dessèchement. Mais c'est surtout sur les fruits qu'apparaissent les symptômes les plus dommageables pour la commercialisation avec la formation de croûtes noirâtres ligneuses. En effet ces tâches, malgré l'absence de mycotoxine, empêchent la commercialisation des pommes et peuvent donc entrainer une importante perte économique qui peut aller jusqu'à 100% de la production qui ne peut être commercialisée en tant que fruit frais en l'absence de traitement (Belete et al., 2017; Léveillé, 2011)

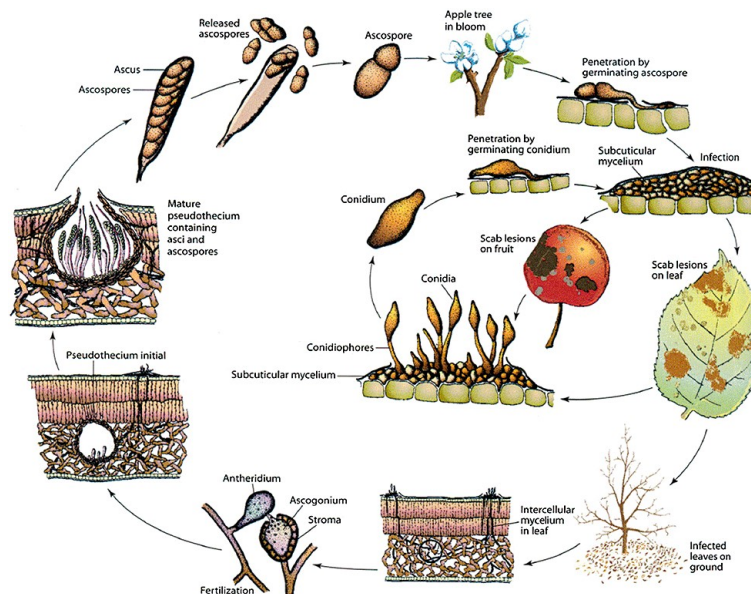


Figure 2 : Cycle de développement du champignon *Venturia inaequalis* (Bowen et al., 2011)

La tavelure est présente partout où il y a des cultures de pommier. Il existe des fongicides permettant de lutter contre cette maladie, mais pour raisonner et réduire leur utilisation il est important de faire de la prophylaxie. Il est par exemple possible de réduire l'inoculum primaire en ramassant tout simplement les feuilles tombées au sol à la fin de l'automne. Ou encore de choisir des variétés moins sensibles (Didelot et al., 2018). Pour mieux comprendre la différence existant entre les variétés, il faut s'intéresser au fonctionnement des défenses des plantes.

1.3- Les défenses des plantes

Face au contact d'un agent pathogène, les plantes peuvent avoir deux types d'interactions. Il peut s'agir soit d'une relation non-hôte où aucune maladie ne se déclenche avec en général l'absence totale de symptôme du fait d'une résistance complète d'une espèce végétale vis-à-vis d'un bioagresseur. Soit, nous sommes dans une relation hôte où nous pouvons observer une interaction incompatible (la résistance qualitative) ou une interaction compatible (la résistance quantitative) entre l'espèce végétale et l'agent pathogène (Laloi, 2016).

1.3-1. Résistance qualitative et résistance quantitative

Dans le premier cas, il s'agit d'une reconnaissance spécifique du pathogène par la plante. Cela suit le principe de la réaction gène pour gène. Le concept est le suivant (figure 3, à gauche), la protéine produite par un gène majeur d'avirulence (Avr) du pathogène est reconnue par la protéine d'un gène majeur de résistance (R) de la plante. La reconnaissance est spécifique entre le gène d'avirulence et le gène de résistance, cela fonctionne comme une paire (Flor, 1971). Il s'en suit une réaction d'hypersensibilité avec un arrêt complet de l'infection, on parle alors de

résistance totale. Cependant, ce type de réaction étant très spécifique, la mutation du gène d'avirulence peut entraîner une non reconnaissance du pathogène par le gène de résistance (Léveillé, 2016).

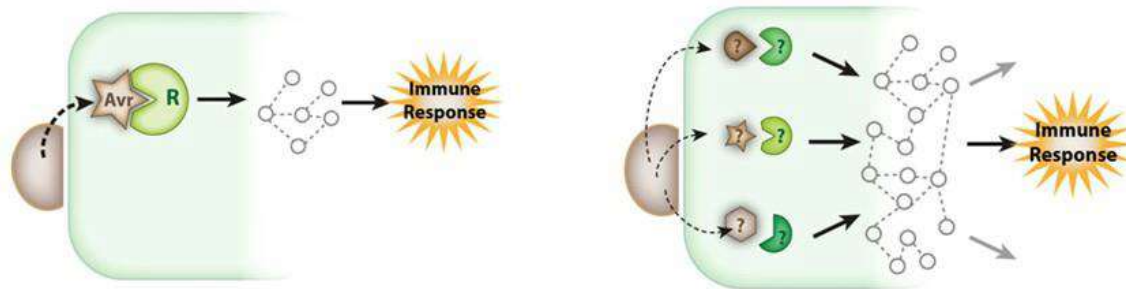


Figure 3 : Schéma représentatif des réactions de la résistance qualitative (à gauche) et de la résistance quantitative (à droite) (Roby and Raffaele, 2016)

Dans le deuxième cas, la résistance est qualifiée de partielle (figure 3, à droite). Les défenses mises en place par la plante ne sont pas aussi efficaces que dans le cas d'une résistance totale. Cette résistance est en général polygénique (Laloi, 2016). Les plantes présentent une variabilité de réaction allant de partiellement résistantes à sensibles. Elles sont dites résistantes lorsque les réponses immunitaires mises en place limitent le développement du pathogène. La sévérité de la maladie est réduite avec peu d'apparition de symptôme et pas ou peu d'impact sur la plante, elle est tolérante (Cooper, 1983). Si la plante est dite sensible, l'interaction peut mener à sa mort. Pour lutter contre l'attaque du bioagresseur, elle dispose de deux types de défense, les défenses constitutives et les défenses induites.

1.3-2. Défenses constitutives et induites

Les défenses constitutives également nommées défenses passives correspondent aux défenses qui sont présentes au niveau basal. Ce qui signifie qu'elles sont toujours présentes dans la plante avec ou sans bioagresseur. Elles font partie des éléments de base produits en permanence. Il s'agit de barrières physiques avec notamment la cuticule et les autres barrières structurales existantes (poils, épines...) mais aussi d'éléments chimiques (composés phénoliques, alcaloïdes...) (Benhamou and Rey, 2012). Il s'agit donc des premières défenses de la plante que rencontrent les bioagresseurs. Si ces derniers réussissent à passer ces barrières, ce sont alors les défenses induites qui entrent en jeu.

Elles sont appelées ainsi car leur mise en place est induite par la présence du bioagresseur. Elles correspondent aux défenses mises en place après la reconnaissance du pathogène. Nous retrouvons dans ces défenses trois types de mécanismes : (i) la signalisation à partir du point d'entrée du pathogène pour permettre à l'ensemble de la plante de se préparer et ainsi limiter la vitesse de propagation (ii) la mise en place de barrière chimique avec la production de molécules toxiques et (iii) le renforcement des barrières physiques avec un épaissement et une rigidification des parois des cellules pour limiter l'entrée du pathogène. Ces mécanismes sont gérés par de nombreux gènes de défenses. Nous pouvons pour la première catégorie citer des gènes impliqués dans la voie de l'acide salicylique, phytohormones de défense, tel que EDS1 (enhanced disease susceptibility protein 1) ou le facteur de transcription WRKY 30. Pour les barrières chimiques, il s'agit par exemple de gènes codant pour des protéines PR (Pathogenesis related) et pour les barrières physiques de gènes codant pour des molécules tel que la callose (Marolleau et al., 2013).

Dans le cas où la perception ou reconnaissance du bioagresseur ne se fait pas correctement, ces défenses peuvent ne pas se mettre en place convenablement mais cela peut également être dû à une mauvaise signalisation ou une mauvaise mise en place des défenses. L'absence ou le

mauvais fonctionnement d'un des éléments de la réponse immunitaire est à l'origine de la sensibilité de la plante. Pour les rendre plus résistant il faudrait donc pouvoir améliorer cette réponse. C'est ce qui est tenté avec les stimulateurs de défenses des plantes.

1.3-3. Stimulateur de défense des plantes

Le réseau mixte technologique, Elicitra, qui travaille sur la compréhension, le développement et la promotion des stratégies de défenses des plantes nous donne la définition suivante des SDP : « Toute substance ou tout micro-organisme vivant non pathogène qui, appliqué sur une plante, est capable de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée, face à des stress biotiques. » (Elicitra, 2019). Les SDP peuvent être également appelés stimulateurs de défense naturelles (SDN). La définition des SDN englobe la capacité d'induire une résistance aux stress biotiques mais également les stimulateurs pouvant induire une résistance aux stress abiotiques comme les carences ou le froid (Faessel et al., 2014).

Ces éliciteurs peuvent agir de deux manières. Soit par un effet direct en déclenchant les défenses immédiatement, soit un effet potentialisateur en préparant la plante à déclencher ses défenses pour une future attaque. Dans tous les cas, ils n'ont pas d'effet direct sur le pathogène, ils ne doivent pas être biocides. Cela les classerait comme pesticides et non pas comme produit de biocontrôle (Marolleau et al., 2013).

Dans cette étude, nous nous intéressons principalement au Bion®, un produit de l'entreprise Syngenta. La molécule active est un analogue de l'acide salicylique, l'acibenzolar-S-Méthyl (Syngenta, 2019). Cet acide a une action similaire aux composés allélopathiques et il active les réponses de défense des plantes (Tripathi, 2010).

Les SDP sont reconnus comme un atout et une piste de travail dans le contexte actuel de diminution des produits phytopharmaceutiques. Cependant leur efficacité peut être encore assez variable en vergers, faute de connaissances approfondies sur leur action et leur condition d'efficacité optimales. Des substances ayant démontré une efficacité intéressante en laboratoire ne le seront pas forcément au champ en raison des variations environnementales ou encore du stade de développement des plantes (Pajot and Fayot, 2019)

1.4- Le projet PREDIRE

C'est dans ce cadre que l'équipe ResPom de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) a proposé le projet PREDIRE (PREDIction of RESistance in apple) en 2016. Pour réduire le nombre de traitements phytopharmaceutiques, les travaux de recherche de l'équipe reposent sur deux principaux enjeux : la résistance génétique et l'utilisation de stimulateurs de défense des plantes (SDP) efficace en verger.

L'hypothèse de départ du projet est que le niveau constitutif des défenses basales est à l'origine de la capacité de défense de la plante pour résister et contrôler les attaques des bioagresseurs, ce phénomène a déjà été démontré chez le riz vis-à-vis de l'agent pathogène *Magnaporthe oryzae* (Vergne et al., 2010). L'utilisation des SDPs permettrait également d'améliorer cette capacité. Pour explorer cette hypothèse, (i) le niveau d'expression constitutif de gènes de défense doit être évalué par RT-qPCR sur un grand pool génétique de pommiers, ainsi que (ii) la variabilité génétique héréditaire jusqu'à la détection de eQTLs par GWAS et enfin (iii) la corrélation avec la résistance aux bioagresseurs et l'efficacité des SDPs.

La méthode appliquée lors du projet se découpe en quatre phases :

- 1- Caractériser environ 50 familles de gènes impliquées dans la défense du pommier
- 2- Dessiner et valider des amorces robustes pour 15 à 20 gènes de défenses sur une trentaine de variétés de pommiers sélectionnées pour représenter la diversité de résistance aux bioagresseurs étudiés

- 3- Evaluer la variabilité génétique au niveau constitutif de 3 gènes de défenses qui pourront être analysés par étude de génétique d'association sur environ 400 variétés
- 4- Analyser le niveau de corrélation entre l'expression constitutive des gènes et la résistance au feu bactérien (*Erwinia amylovora*) et à la tavelure (*Venturia inaequalis*) ou à l'efficacité des SDPs sur la trentaine de variétés et sur les 400 variétés. (Durel et al., 2016)

Le projet PREDIRE a commencé en 2017 donc lors de mon arrivée dans l'équipe, les étapes de caractérisation bio-informatique et de dessin des amorces étaient déjà réalisées. Une première caractérisation de l'expression constitutive de 13 gènes de défense prédéfinis a été entreprise en 2017 (stage de William Billaud) et 2018 (stage de Louise Lejus) sur une trentaine de variétés de pommiers issus de la Core Collection INRA (Lassois et al., 2016). Cependant, la nécessité de validation statistique des résultats obtenus sur ce premier sous-ensemble, a poussé l'équipe à répéter cette étape de caractérisation sur un nouveau lot de variétés. Ma mission principale a donc été de caractériser l'expression constitutive de ces mêmes gènes de défenses sur un ensemble de 29 variétés de pommiers issus de la même collection. Ma deuxième mission a été d'analyser l'expression de ces 13 gènes pour sélectionner les 3 gènes les plus intéressants et de caractériser leurs expressions sur l'ensemble de la Core Collection. En parallèle, j'ai également suivi et noté un test pathologique de sensibilité au feu bactérien en serre sur la trentaine de variétés de base.

Dans ce mémoire, je vais vous présenter les démarches du projet qui m'ont amené à essayer de répondre à la problématique suivante : dans quelle mesure l'expression constitutive de gènes de défenses peut-elle permettre de prédire l'efficacité du Bion® et le niveau de résistance de variétés de pommiers ? La première partie portera donc sur les méthodes appliquées pour obtenir les informations sur la résistance des variétés au feu bactérien et à la tavelure et celles permettant d'obtenir les informations d'expressions des gènes pour finir avec les analyses qui ont été menées. Dans la deuxième partie nous verrons les résultats obtenus lors des tests de résistance, l'expression constitutive observée pour les différents gènes puis les résultats des analyses de corrélation entre l'efficacité du Bion®, le niveau de résistance aux deux bioagresseurs et l'expression relative des gènes étudiés. Puis nous finirons avec l'analyse de ces résultats et les conclusions que nous pouvons en tirer ainsi que les perspectives pour la suite du projet.

2. Matériel et Méthodes

2.1- Matériel végétal

L'ensemble des analyses de biologie moléculaire et du phénotypage est réalisé sur la Core Collection (CC) de variétés de pommier de l'IRHS. Cette collection est constituée d'environ 400 génotypes. L'ensemble de ces génotypes sont plantés dans le verger de l'unité expérimentale Horti d'Angers sur le site de la Rétuzière.

Trente-deux génotypes, appartenant à la Core Collection, ont été sélectionnés suivant leur niveau de résistance à la tavelure et au feu bactérien (données acquises au cours de la thèse de Diane Leforestier, 2015)). L'objectif étant d'avoir une représentation de la diversité du niveau de résistance aux deux pathogènes. Pour faciliter la compréhension de la suite du mémoire, ces 32 génotypes seront nommés « population A » et les numéros d'accessions seront utilisés pour les analyses (la correspondance avec les noms de variétés est en annexe I). La population A a été utilisée pour les premières analyses statistiques portant sur la variabilité de l'expression constitutive des gènes de défenses et la sélection des trois gènes les plus pertinents mais aussi pour l'évaluation de l'efficacité du Bion®.

Pour renforcer les analyses statistiques, une extension de 29 géotypes a été utilisée. Ces géotypes ont été choisis parmi les 400 de la CC. Plus précisément parmi les géotypes de la CC dont les échantillons de feuilles ont été prélevés à la même date que la population A. L'ensemble des géotypes de la population A et les 29 géotypes de l'extension seront nommés dans la suite du rapport « population B ».

Pour les différents tests, génétique et phénotypique, le travail se fait sur des plants greffés élevés en serre. Les greffons, prélevés sur les géotypes d'intérêts au verger, sont greffés sur le porte-greffe MM106 pour sa vigueur. Les conditions de croissance en serre sont : 24°C la journée / 22°C la nuit avec un taux d'humidité de 70% suffisant pour la croissance. Il faut environ 4 semaines pour obtenir des plantes d'environ 15-20 cm en croissance.

2.2- Phénotypage

2.2-1. Feu bactérien

Les tests avec *Erwinia amylovora* ont été réalisés en serre sécurisée de type S2 par rapport au statut de maladie à traiter comme une maladie de quarantaine. La période idéale pour réaliser ce type d'essai est la fin du printemps.

Pour le matériel végétal, avant le début de l'essai nous réalisons un tri et une sélection des plants pour avoir des copies biologiques saines et proches au niveau du développement physiologique.

Deux jours avant l'inoculation, nous appliquons les deux modalités de traitement : Bion® et eau. Pour le SDP deux dosages différents ont été utilisés entre les deux essais (2018 et 2019). Pour le premier, le Bion® a été appliqué en demi-dose (0,2 g/L). Cela n'a pas suffi à protéger correctement les plants tout en gardant une variabilité de résistance observable entre les géotypes. C'est pourquoi pour le deuxième essai l'équipe l'a donc appliqué en « pleine » dose (dose recommandée par Syngenta), soit 0,4 g/L.

La préparation de l'inoculum se fait à partir de la souche CFPB1430 conservée dans la banque de bactérie de l'IRHS. Une semaine avant l'inoculation, les bactéries sont mises en culture. Elles sont repiquées la veille de l'inoculation pour être en phase exponentielle de croissance. Et nous préparons le jour même une suspension de concentration 10^8 UFC/mL.

Pour réaliser l'inoculation, nous avons utilisé des ciseaux trempés dans l'inoculum pour couper les deux plus jeunes feuilles développées des plants. Nous retrempions bien les ciseaux entre chaque coupe, pour être sûr d'apporter une charge d'inoculum suffisante dans la blessure réalisée. Les conditions de maintien ne doivent pas excéder 30°C et l'humidité doit être entre 70% et 80%.

Nous réalisons des notations à trois dates J+7, J+14 et J+21. Nous avons relevé la longueur totale de la pousse et la longueur de la nécrose. Dans le cas où cette dernière ne touche que la nervure des feuilles coupées, nous avons noté NN pour Nécrose Nervure et si c'est la nervure et le pétiole on note NNP pour Nécrose Nervure Pétiole. Ces notations sont converties respectivement en 0,5 et 1 pour les analyses et nous ajoutons 1 à toutes les autres valeurs sauf pour celles égales à 0 que nous maintenons à 0.

2.2-2. Tavelure

Pour les essais avec la tavelure, nous avons utilisé la souche EU-B04. Il s'agit d'une souche d'agressivité moyenne. Elle permet de ne pas masquer la variabilité avec la modalité eau si la souche attaque trop fortement tous les géotypes et à l'inverse de voir quand même des symptômes avec le traitement au Bion® qui pourraient être inexistant si la souche est faiblement agressive. Le meilleur moment pour réaliser ce type d'essai est au début du printemps pour éviter d'avoir des températures trop élevées.

Pour le matériel végétal un tri et une sélection sont également faits comme pour les tests de résistances au feu bactérien.

De la même manière, nous avons appliqué deux jours avant inoculation les modalités de traitement eau et Bion®. Là encore deux dosages différents ont été utilisés entre les deux tests (2017 et 2018). Pour le premier, l'équipe a appliqué le SDP en pleine dose (0,4g/L) mais cela a été trop efficace. Il y a eu peu de symptômes et de sporulation. Pour la deuxième, le Bion® a été appliqué en demi-dose (0,2g/L).

La préparation de l'inoculum se fait le jour de l'inoculation. Nous préparons une solution de suspension de spores de *Venturia inaequalis* qui ont été cultivés sur des feuilles de pommier. Là encore la souche nous provient de l'IRHS, plus précisément de l'équipe EcoFun. Nous récupérons les spores en plaçant les feuilles dans des shakers avec de l'eau distillée. Nous ajustons ensuite la solution obtenue de manière à avoir une concentration de 250 000 spores/mL. Nous inoculons en fin de journée en pulvérisant cette solution sur les plants. Lors de l'inoculation et pendant deux jours les végétaux sont sous bâches pour garder un niveau élevé d'humidité pour l'installation du champignon. Les conditions, durant cette étape, sont de 15°C à 16°C et une humidité de 100% sous les bâches.

Les conditions de maintien sont ensuite de 18°C avec 70% à 80% d'humidité. Nous notons à trois dates J+14, J+21 et J+28. Nous évaluons tout d'abord la réaction du génotype suivant une grille de notation des symptômes d'après Chevalier et al., 1991 visible sur la figure 4. Nous évaluons également l'importance de la sporulation en estimant un pourcentage de couverture de la feuille qui est retranscrit sur une échelle de 0 à 7 avec 0 l'absence de sporulation et 7 entre 75% et 100% de la feuille couverte (figure 5).

Note	Description des réactions
0	Aucune réaction ni sporulation ne sont visibles sur les feuilles. La plante est résistante à la race testée.
1	Une réaction est visible sous forme de piqure d'épingle due à un affaissement des cellules autour de l'impact de la tavelure. Aucune sporulation n'est visible. La plante est résistante.
2	Aucune sporulation n'est visible macroscopiquement, les feuilles réagissent, elles se crispent voire se nécrosent. La plante est résistante.
3a	On observe une réaction des feuilles qui se gaufrrent ou se crispent, avec une légère sporulation qui est séchante. La plante est considéré comme résistante.
3b	sporulation qui tend plus ou moins à s'étendre. La plante est considérée comme moyennement sensible, elle réagit mais ne bloque pas totalement le développement de la tavelure.
4	Aucune réaction visible, la tavelure se développe de manière importante sur le limbe. Cette plante est sensible.

Figure 4 : Echelle de notation des symptômes de réaction d'après Chevalier et al., 1991

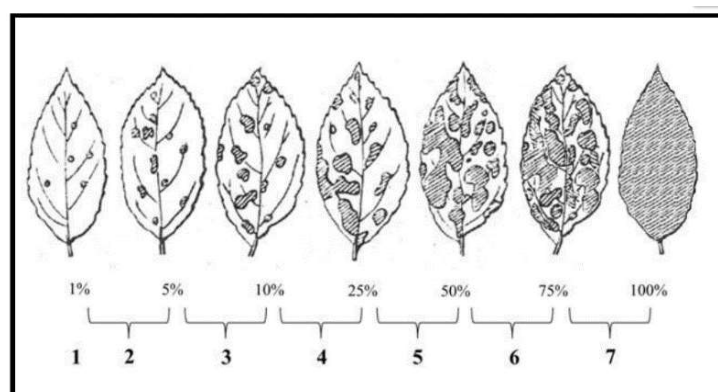


Figure 5 : Echelle de notation de l'importance de la sporulation par pourcentage de couverture de la feuille (document adapté de la version de Croxall et al., 1952)

2.3- Expressions constitutives

2.3-1. Extraction et transcription inverse

Sur les plants greffés en croissance, l'équipe a prélevé les deux plus jeunes feuilles déroulées. Elles ont été coupées en deux pour avoir deux échantillons avec une moitié de chaque feuille. Un tube forme l'échantillon principal et le deuxième servira de « back-up » (échantillon de secours). Au fur et à mesure du prélèvement, ils ont été plongés dans l'azote liquide pour stopper les réactions biologiques des morceaux de feuilles. Ils sont ensuite maintenus à -80°C pour leur conservation.

Tous les génotypes ont été prélevés en 2 copies biologiques, sauf ceux de la population A qui ont été prélevés en 3 copies biologiques. Plusieurs séries de prélèvements ont été nécessaires du fait du grand nombre de génotypes. La figure 6 récapitule le nombre de génotypes qui ont été prélevés lors de la même série en un ou deux réplicats biologiques. Les valeurs entre deux séries représentent le nombre de génotypes dont un réplicat a été prélevé lors de l'une des séries et l'autre réplicat lors de l'autre série.

	SERIE 1 11/03/16	SERIE 3 17/03/16	SERIE 5 21/03/16	SERIE 6 01/04/16	SERIE 7 28/09/16
SERIE 1 11/03/16	6 / 7	19	6	1	2
SERIE 3 17/03/16		55 / 8	41	21	11
SERIE 5 21/03/16			38 / 4	35	6
SERIE 6 01/04/16				25 / 11	10
SERIE 7 28/09/16					65 / 3

2 copies
1 copie

Figure 6: Tableau récapitulatif des prélèvements de répliquas biologiques en fonction des dates de prélèvement (source : Elisa Ravon)

Pour l'extraction de l'ARN (annexe II, protocole d'extraction), des billes d'acier ont été ajoutées au préalable dans les tubes de prélèvements. La première étape consiste au broyage des feuilles par agitation des tubes encore congelés. Ensuite l'équipe s'est servi du kit d'extraction NucleoSpin® RNA Plant pour récupérer uniquement l'ARN.

L'étape suivante est la transcription inverse (annexe III, protocole RT-PCR). Des enzymes transcriptases inverses permettent de reconstituer de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN extrait. On l'utilise pour évaluer l'expression des gènes car il est plus stable que l'ARN, plus facile à analyser (stockage, copie et séquençage) et amplifiable (ENS Lyon, n.d.).

Pour finir on réalise une PCR pour vérifier la présence de l'ADNc et l'absence d'ADN génomique (ADNg) pour éviter les interférences dans les résultats futurs. Après l'amplification, nous faisons migrer les échantillons par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. Pour confirmer notre attente, nous devons observer uniquement une bande par échantillon qui correspond à notre ADNc.

2.3-2. Sélection des gènes et dessin des amorces

Au départ du projet, 50 familles de gènes de défenses ont été sélectionnées. Vingt-huit familles ont été étudiées au préalable par l'équipe ResPom lors de la conception de la qPFD®. Il s'agit d'une puce à faible densité quantitative. Elle permet de tester les réactions de défense par rapport à l'utilisation d'un SDP suivant les cinq grandes voies de défenses (Perraut, 2011). Les gènes liés à la signalisation ont été écartés du test par la suite, ces gènes étant connus pour être induits après l'attaque de l'agent pathogène et non à l'état constitutif dans la plante. Certaines familles ont également été étudiées avec les autres projets de recherche de l'équipe. Toutes ces

familles de gènes ont été analysées par l'équipe Bidefi, de l'IRHS. A partir de la dernière version du génome, ils ont analysé les séquences des différentes familles sur les séquençages des génotypes réalisés par Duan et al. (2017), mais aussi identifié les zones non polymorphes pour faciliter le dessin d'amorces le plus spécifique possible. Il s'agit de zones dépourvues de SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Elles sont donc invariables entre les génotypes. Pour valider les séquences à cibler des familles peu connues, un travail de phylogénie des séquences a été réalisé par l'équipe. Ils sont passés par une étude bibliographique pour trouver des séquences similaires dont le rôle a été validé fonctionnellement sur d'autres espèces. Ainsi la séquence, de la famille de gène, la plus proche de celles fonctionnelles de la littérature a été choisie pour la suite du projet (exemple de la famille Bet v1 en annexe IV pour la séquence de gène MD16G1160700).

Une fois les séquences choisies, le dessin des amorces a été réalisé avec le logiciel PrimerQuest Tool® (Owczarzy et al., 2008). Elles ont été dessinées au niveau des zones non polymorphes pour réduire le risque de mauvaises hybridations sur la grande diversité de variétés étudiées. Un premier contrôle de spécificité a été fait avec le logiciel Multalin (Corpet, 1988) pour vérifier que l'amorce ne s'accroche pas à d'autres séquences de la famille de gènes. Nous avons ensuite testé ces amorces en mesurant leur efficacité et leur spécificité avec le thermocycleur qPCR (annexe V : protocole de test des amorces). On les a testés sur un pool des génotypes à étudier avec différentes concentrations. Nous utilisons le logiciel CFX Maestro fourni avec le thermocycleur. Il nous permet d'obtenir l'efficacité avec la courbe standard. La valeur d'efficacité doit être comprise entre 80% et 110% avec un R² supérieur à 0,96 pour confirmer un bon alignement des points de la gamme. Pour la spécificité, nous nous intéressons à la courbe de fusion qui doit présenter un seul pic.

Après toutes ces étapes nous avons obtenu un lot de 11 gènes de défenses visibles dans le tableau 1 ci-dessous (tableau complet avec les amorces utilisées en annexe VI).

Tableau 1 : Récapitulatif des gènes de défenses validés pour les analyses (activités tirées de l'article Marolleau et al., 2013)

Mécanisme de défenses	Voie de défenses		Nom du gène
Barrière chimique	PR protéines		Classe III chitinase (PR-8)
			PR-10
	Assimilée à une PR protéine		Agglutinine (Agg)
	Métabolisme secondaire	Voie des phénylpropanoïdes	Polyphenol oxidase (PPO)
		Voie des isoprénoïdes	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase (HMGR)
			Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS)
		Voie de la cystéine	Cystéine lyase (CSL)
Stress oxydant		Ascorbate peroxidase (APOX)	
Barrière physique	Modification pariétale		Cinnamyl alcool dehydrogenase (CAD)
			Callose synthase (CaLS)
			Extensine

2.3-3. Expression des gènes

Pour mesurer l'expression constitutive de ces gènes, nous avons réalisé des réactions de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR). Il s'agit d'une amplification exponentielle de

l'ADNc que l'on suit en temps réel grâce à des sondes fluorescentes. Nous utilisons pour cela des plaques de 96 puits où nous plaçons 15µL de mix et 3µL d'ADNc dilué au 1/20ème. Le mix est constitué de Mesa blue qPCR Master Mix, des amorces et d'eau extra pure. Les quantités varient en fonction de la concentration de l'amorce nécessaire pour avoir la meilleure efficacité. Le cycle d'amplification que nous utilisons est le suivant : 1. 95°C 5 min, 2. 95°C 0,03 min, 3. 60°C 1 min, 4. retour à l'étape 2 pour 39 fois, 5. 55°C 0,05 min, 6. 95°C 0,5°C/cycle. Chaque échantillon biologique est disposé sur la plaque en triplicat ou duplicat technique. Sur chaque plaque, nous plaçons des génotypes identiques pour servir de pont entre les différentes plaques.

En plus de nos 11 gènes d'intérêt, nous faisons passer en qPCR des gènes de référence également appelé gène de ménage. Il s'agit de gènes qui s'expriment chez tous les végétaux car nécessaire à la survie de la cellule (ENS Lyon, n.d.). Ils vont nous permettre par la suite de normaliser l'expression des autres gènes. Nous utilisons 3 gènes : l'actine (Actine), la tubuline alpha chaîne (TuA) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

A la fin du cycle nous obtenons des données de quantification du cycle Cq. Il correspond au nombre de cycle nécessaire pour détecter un même niveau de fluorescence entre les échantillons (Oswald, 2015).

2.4- Analyses statistiques

2.4-1. Analyses de l'expression constitutive

A partir de ces données nous appliquons la méthode $\Delta\Delta Ct$ tiré de l'article de Vandesompele et al. (2002), en utilisant nos données de Cq comme données de Ct (Cycle Threshold).

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{gène de référence}}) - (Ct_{\text{calibrateur}} - Ct_{\text{gène de référence}})$$

La première étape porte sur la vérification des gènes de ménage, nous calculons des moyennes géométriques à partir de toutes les variations par paire des gènes de ménage. Pour chaque échantillon la moyenne doit être comprise entre 0,3 et 3. Si ce n'est pas le cas, cela peut signifier que nous avons eu un problème d'amplification d'un ou plusieurs gènes de ménage pour cet échantillon. Dans ce cas nous cherchons un autre génotype où les valeurs des autres gènes de référence sont similaires à celles viables observées pour notre échantillon. Nous utilisons la valeur du gène de référence de cet échantillon dont les autres gènes sont proches pour avoir une donnée de Cq viable pour le premier échantillon. Pour ce qui est des valeurs des échantillons nous utilisons la moyenne des Cq des copies techniques si elles ne sont pas éloignées de plus ou moins 2 unités de Cq. Nous réalisons également sous R un ajustement des données de Cq pour supprimer l'effet « plaque » qui correspond à la variabilité engendrée par la manipulation (préparation, temps d'attente et amplification) entre les différentes plaques. Nous utilisons le modèle « Cq ~ effet plaque + résidus ». Nous récupérons les résidus qui correspondent à tous les autres éléments autres que l'effet plaque qui expliquent la variabilité du gène. Puis nous appliquons ces résidus à nos moyennes.

Une fois les données nettoyées et préparées, nous ajustons les données par rapport à un génotype calibrateur. Nous avons utilisé la variété Eri Segara (X00700) pour le sous-échantillon et l'extension. Et pour la Core Collection nous avons utilisé un pool de l'ensemble des génotypes dilué au 1/20^{ème}. Les données sont ensuite normalisées par rapport aux gènes de référence.

A partir de la valeur obtenue avec la méthode $\Delta\Delta Ct$ nous calculons une quantification relative (QR) pour obtenir une expression relative du gène d'intérêt.

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Pour permettre une meilleure lecture des résultats, les analyses qui suivent sont réalisées à partir du \log_2 du QR.

Pour les analyses, nous réalisons des représentations graphiques de la variabilité des génotypes (« ggplot2 », Wickham, 2016). Nous l'évaluons également avec une analyse de variance (ANOVA) suivant le modèle « Expression relative du gène ~ génotype + résidus », pour évaluer si la variabilité des génotypes explique significativement la variabilité d'expression. Nous calculons l'héritabilité (h_{SL}^2), avec « n » le nombre de copies moyens par génotype (package R « heritability » de Kruijer et al., 2015) et « σ » la variance. De manière à évaluer la part du facteur génotype dans la variabilité de l'expression du gène. Nous avons également calculé le coefficient de variation génotypique (CVg) pour analyser l'étendue de la variation autour des moyennes d'expression (moyenne arithmétique).

$$h_{SL}^2 = \frac{\sigma_{g\acute{e}notypique}^2}{\sigma_{g\acute{e}notypique}^2 + \frac{\sigma_{r\acute{e}sidual}^2}{n}}$$

$$CVg = 100 * \left(\frac{\sigma_{g\acute{e}notypique}}{\text{moyenne d'expression}} \right)$$

2.4-2. Analyses du phénotypage avec le stimulateur de défense des plantes

Pour les analyses à partir des données de phénotypage, nous calculons tout d'abord les aires sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC). Pour la tavelure nous utilisons les notations de sporulations pour le calculer avec la formule suivante :

$$AUDPC_{tavelure} = \left(\frac{0 + SpoJ14}{2} * 14 \right) + \left(\frac{SpoJ21 + SpoJ14}{2} * 7 \right) + \left(\frac{SpoJ21 + SpoJ28}{2} * 7 \right)$$

Et pour le feu bactérien, c'est presque la même formule et on utilise le ratio longueur de nécrose sur longueur totale.

$$AUDPC_{feu} = \left(\frac{0 + RatioJ7}{2} * 7 \right) + \left(\frac{RatioJ14 + RatioJ7}{2} * 7 \right) + \left(\frac{RatioJ21 + RatioJ14}{2} * 7 \right)$$

A partir de ces AUDPCs on calcule la différence entre la modalité eau et la modalité Bion® et également l'efficacité du Bion®.

$$\text{efficacité du Bion}^{\circledR} = \frac{AUDPC \text{ eau} - AUDPC \text{ Bion}^{\circledR}}{AUDPC \text{ eau}} * 100$$

Nous avons également réalisé des analyses exploratoires sous Excel pour analyser la variabilité de la sensibilité en fonction des génotypes.

2.4-3. Corrélation entre l'expression et le phénotype de la Core Collection

Pour calculer les corrélations, nous utilisons sous R la fonction « cor.test » (Best and Roberts, 1975; Hollander et al., 2013) avec la méthode de Pearson. Nous utilisons les données d'expression relative en \log_2 et les AUDPCs.

Pour la Core Collection, nous avons sélectionné un test tavelure et un test feu bactérien sur les nombreux réalisés au cours des dernières années. Les critères de choix ont été la souche, le nombre de génotypes présents et le nombre de copies de ces génotypes. Nous utilisons pour la tavelure un test d'automne 2016 avec la souche EU-B04 (la même souche que pour les tests avec SDP) et pour le feu bactérien le test de 2013. Du fait de l'ajout d'une extension de

génotypes les analyses avec le sous-échantillon de la Core Collection sont également menées sur ces tests de résistance.

3. Résultats

3.1- Analyse de la variabilité d'expression constitutive des gènes de la population A et de l'efficacité du Bion®

3.1-1. Phénotype de résistance au feu bactérien et à la tavelure de la population A avec l'application de Bion®

Deux génotypes de cette population sont absents des tests : le génotype X00395 est absent du premier test tavelure et du premier test feu bactérien et le génotype X07198 est absent du premier test feu bactérien. Des témoins ont été ajoutés aux tests sur le feu bactérien : trois témoins sensibles (X00922, X00972 et X04712) et un témoin résistant (X02369). Pour les tests de résistance à la tavelure, nous avons utilisé deux témoins sensibles (X00972 et X04712). Les tests de phénotypage montrent une diversité de réaction de la part des génotypes. C'est particulièrement visible avec le test de résistance à la tavelure (figure 8).

Pour le feu bactérien, si on compare les résultats obtenus avec les différentes concentrations du Bion® nous pouvons observer que l'étendue des valeurs d'AUDPC est plus importante pour 2019 avec une concentration de 0,4g/L (figure 7) que pour 2018 avec une concentration de 0,2g/L (annexe VII). Pour le test de cette année, les valeurs d'AUDPC avec l'application du Bion® vont de 0,52 à 16,05 et elles vont de 0,03 à 10,40 pour le test de 2018. Nous observons la même tendance avec l'application de l'eau avec 0,74 à 16,92 de valeur d'AUDPC pour le test de 2019 et 0,09 à 12,10 pour le test de 2018.

Si nous nous intéressons aux écarts-types du test de 2019, les valeurs dans le cas de l'application du Bion® présente une plus grande échelle de valeurs que l'écart des valeurs de copies du même génotype avec l'application de l'eau. Nous pouvons également observer une variabilité de la différence « Eau-Bion® ». La figure 7 montre que pour certains génotypes, malgré un même niveau de sensibilité après traitement à l'eau, la sensibilité après traitement au Bion® est variable. Par exemple le génotype X02953 qui a une différence de 0,97 pour une réaction avec l'eau de 13,97 et le génotype X08609 qui a une différence de 10,14 pour une réaction avec l'eau de 13,85. Autre point visible sur le graphique de la figure 7, nous pouvons voir que certains génotypes sont plus sensibles avec le Bion® qu'avec la modalité eau, cependant leur différence est faible de -1,04 à -0,04. Pour ce qui est de l'efficacité du SDP, les résultats vont de -14% à 81%.

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et efficacité des stimulateurs de défense des plantes

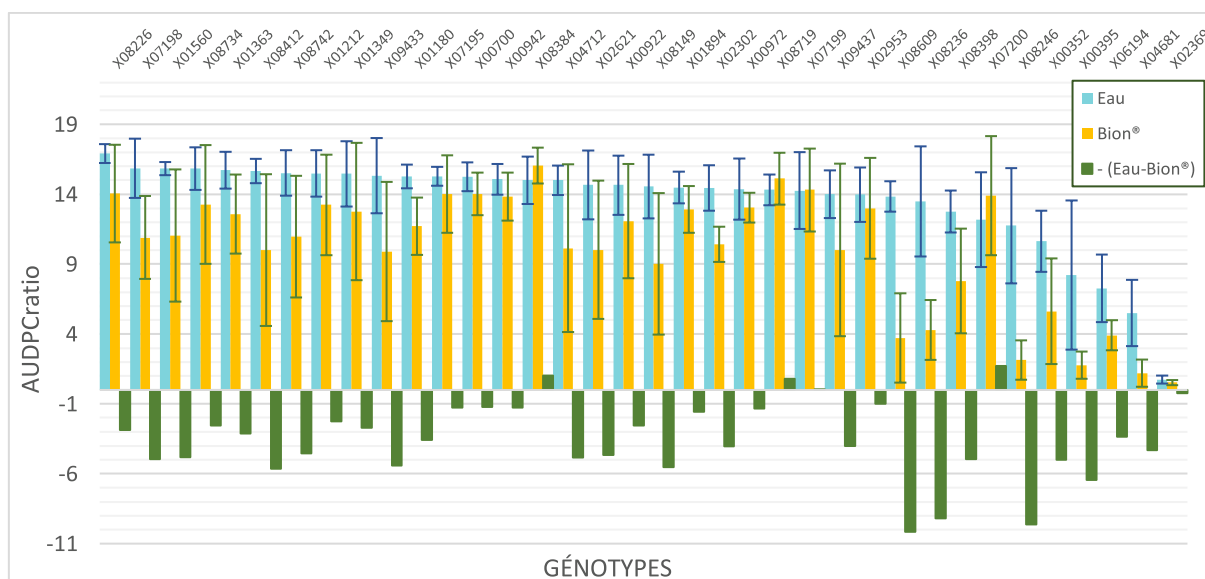


Figure 7 : Graphique de l'AUDPC du ratio longueur de nécrose sur longueur total du test feu bactérien (2019) avec l'application de la modalité eau (bleu), avec l'application du Bion® à 0,4g/L (jaune) et la différence Eau-Bion® (vert)

Les résultats du test de résistance à la tavelure de 2018 sont visibles sur la figure 8. Nous pouvons observer que 22 génotypes sont résistants à la souche EUB-04 (AUDPC inférieur à 10) dont 8 ont une valeur d'AUDPC égal à 0 avec l'application du Bion® (en jaune). Si nous regardons les résultats du test de 2017, visible en annexe VI, avec une concentration en Bion® deux fois plus importantes (0,4g/L) nous pouvons voir qu'il y avait 27 génotypes résistant, dont 20 avec une valeur d'AUDPC de 0. Les valeurs d'AUDPC vont de 0 à 121,33 pour l'eau et 0 à 54,25 pour le Bion® lors du test de 2018 et elles vont de 0 à 131,25 pour l'eau et 0 à 67,2 pour le Bion® lors du test de 2017.

La différence « Eau-Bion® » va de -2,1 à 93,1 de valeur d'AUDPC. Nous pouvons également noter que les écarts-types visibles en barre d'erreur sont plus importants avec l'application de l'eau que les écarts-types avec l'application du Bion®. Pour ce qui est de l'efficacité, les pourcentages vont de 0% à 100%.

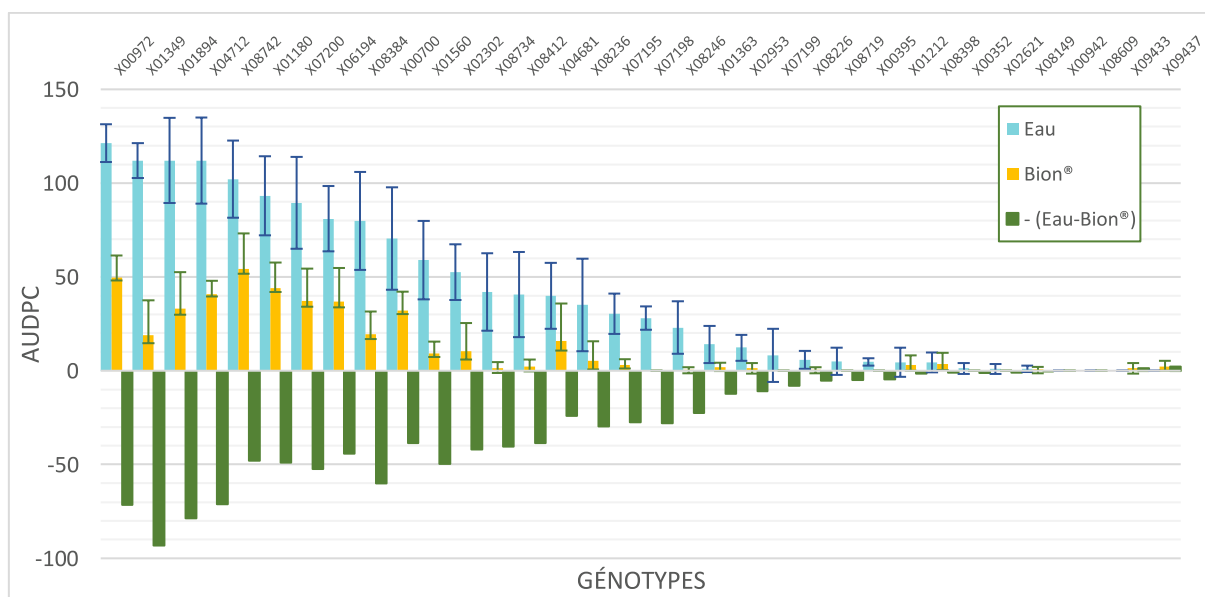


Figure 8 : Graphique de l'AUDPC de la sporulation du test tavelure (2018) avec l'application de la modalité eau (bleu), l'application de la modalité Bion® 0,2g/L (jaune) et la différence Eau-Bion® (vert)

3.1-2. Expression constitutive des gènes de défenses de la population A

Les graphiques des figures 9, 10 et 11 et de l'annexe VIII représentent la variabilité d'expression relative des 11 gènes de défenses en fonction des génotypes du sous-échantillon. Chaque couleur représente un génotype et chaque point de la même couleur représente les valeurs d'expression des différents réplicats biologiques de ce génotype. Les rectangles gris représentent un intervalle de 2,5 d'expression en $\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$.

Nous pouvons observer graphiquement 3 types de variations :

- 1- Des gènes dont l'expression est peu variable entre les différents génotypes, c'est le cas des gènes APOX (figure 9), HMGR, FPPS et CalS (annexe VIII)
- 2- Des gènes dont la variabilité d'expression est intermédiaire, c'est le cas de CSL (figure 10), CAD et Extensine (annexe VIII)
- 3- Des gènes dont l'expression est très variable, c'est le cas des gènes Agg (figure 11), PR8, PR10 et PPO (annexe VIII)

Il est à noter également que certains génotypes ont une importante variation intra-génotype avec des écarts importants entre les différents réplicats biologiques. C'est ce que nous pouvons voir par exemple avec le cinquième génotype X01180 avec l'expression relative du gène APOX sur la figure 9.

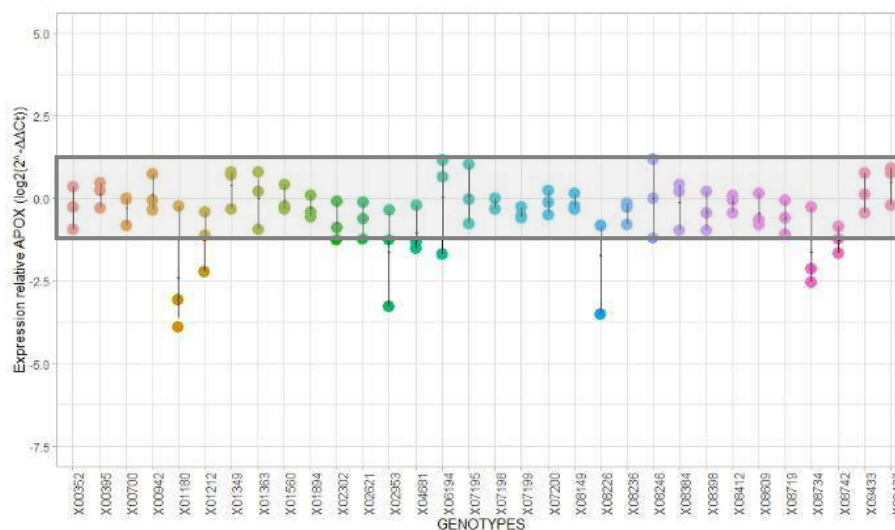


Figure 9 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène APOX ($\log_2(-\Delta\Delta Ct^2)$) pour les génotypes du sous-échantillon

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et efficacité des stimulateurs de défense des plantes

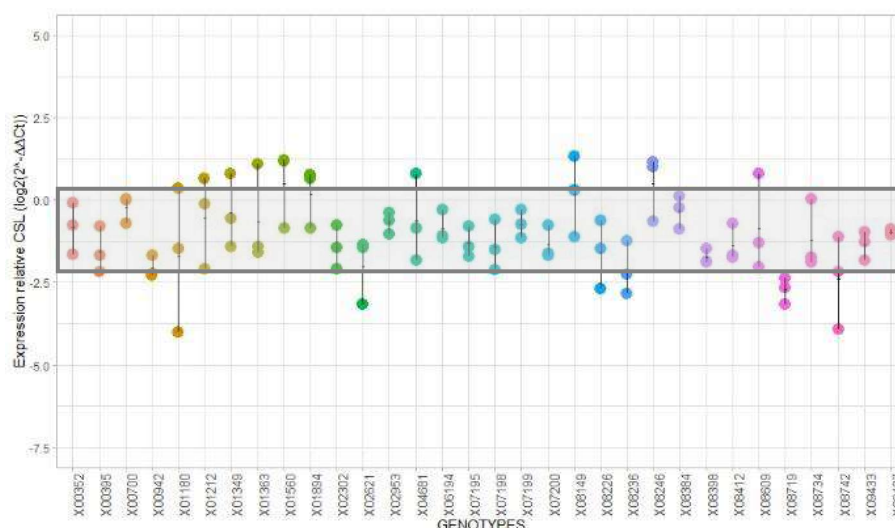


Figure 10 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène *CSL* ($\log_2(-\Delta\Delta Ct)$) pour les génotypes du sous-échantillon

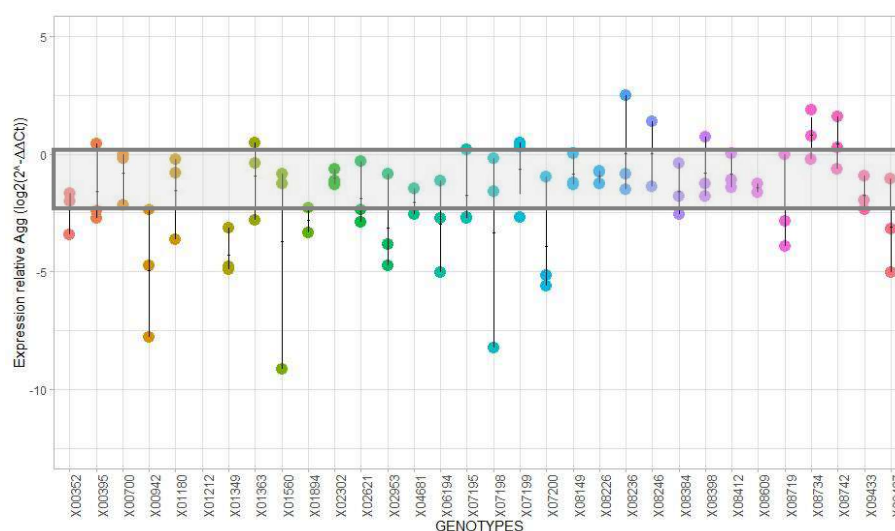


Figure 11 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène *Agg* ($\log_2(-\Delta\Delta Ct)$) pour les génotypes du sous-échantillon

Le tableau 2 présente un récapitulatif des résultats obtenus lors des analyses de l'expression constitutive des gènes sur la population A. L'analyse de variance (ANOVA) permet d'évaluer l'influence du facteur « génotype » sur la variabilité de l'expression constitutive des gènes de défenses. Les résultats de cette analyse montrent que le facteur « génotype » explique de manière significative la variabilité de l'expression des gènes PR10, Agg, HMGR, FPPS, CSL, APOX, CAD et CalS. La part du facteur « génotype » dans la variation de l'expression constitutive est exprimée au travers de l'héritabilité. La valeur d'héritabilité est élevée pour les gènes PR10, FPPS, CSL et APOX et elle est faible pour PR8 et Extensine. Les valeurs de coefficients de variation génétique indiquent que les gènes PR10 et CAD ont les plus importantes amplitudes de variation d'expression autour de leur moyenne d'expression qui sont de 0,04 et -0,02 respectivement. Le gène PR8, malgré la variation d'expression observée sur les graphiques précédents, a une valeur d'héritabilité nulle. La variation de son expression constitutive semble plus expliquée par les résidus du modèle de l'analyse de variance que par les génotypes, ce qui rend le calcul du CVg impossible.

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et efficacité des stimulateurs de défense des plantes

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats d'analyse de l'expression des gènes (sous-échantillon)
Code significativité 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1

	PR8	PR10	Agg	PPO	HMGR	FPPS	CSL	APOX	CAD	CalS	Extensine
Significativité de la variabilité (p-value de l'ANOVA)		***	.		*	***	**	**	*	*	
Héritabilité	0,00	0,70	0,37	0,30	0,40	0,64	0,54	0,51	0,39	0,43	0,15
Coefficient de variation génotypique	NA	2243,90	-46,99	-25,54	63,07	33,48	-57,03	-108,41	-3325,65	31,13	-15,95
Moyenne d'expression	0,54	0,04	-1,79	-2,35	0,50	1,63	-1,04	-0,45	-0,02	0,83	-1,77

3.1-3. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes de défenses de la population A et l'efficacité du Bion®

Nous avons analysé la corrélation entre la différence d'AUDPC (Eau-Bion®) et les expressions relatives au niveau constitutif des gènes d'intérêt et entre l'efficacité du Bion® et ces mêmes expressions. Les résultats sont visibles dans le tableau 3. Les valeurs en gras sont des corrélations significatives. Ce sont les corrélations en rouge qui nous intéressent principalement. Etant des corrélations positives cela signifie que plus la différence entre l'eau et le Bion® ou l'efficacité du Bion® est importante, plus l'expression constitutive du gène est importante. A l'inverse une corrélation négative signifie que plus la différence ou l'efficacité sont importantes moins le gène est exprimé au niveau constitutif.

Les gènes CalS et Agg présentent des valeurs de corrélation significative pour le feu bactérien avec une corrélation de 0,52 entre l'expression de CalS et l'efficacité du Bion® et de 0,40 pour Agg entre l'expression et la différence « Eau-Bion® ». Pour la tavelure, la valeur de corrélation la plus élevée est la valeur de corrélation entre l'expression du gène CSL et la différence « Eau-Bion® ». Il est intéressant de noter que les corrélations entre les expressions des gènes de défenses et les niveaux de résistance vis-à-vis des deux bioagresseurs ne suivent pas forcément la même tendance de corrélation. Par exemple les valeurs de corrélation du gène HMGR sont négatives avec le feu bactérien et positives avec la tavelure.

Tableau 3 : Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et la résistance au feu bactérien et à la tavelure avec l'utilisation du Bion®

		PR8	PR10	Agg	PPO	HMGR	FPPS	CSL	APOX	CAD	CalS	Extensine
Corrélation feu bactérien (2019)	Eau-Bion®	-0,14	0,11	0,40	-0,05	-0,25	0,27	0,05	0,03	-0,05	0,39	0,18
	Efficacité	-0,12	0,03	0,28	-0,16	-0,16	0,23	0,12	0,04	-0,01	0,52	0,16
Corrélation tavelure (2018)	Eau-Bion®	-0,02	0,12	-0,32	0,16	0,15	0,13	0,29	0,19	-0,06	-0,07	-0,19
	Efficacité	-0,09	0,15	0,10	-0,10	0,04	-0,05	0,12	0,06	0,13	0,05	0,02

Si nous comparons les corrélations des tests présentés dans le tableau 3 avec celles des deux autres tests de résistances au bioagresseurs (annexe VII), nous pouvons voir un nombre plus important de corrélations significatives et des valeurs de corrélation en général plus importantes dans les premiers tests. Il y a par exemple une importante différence entre les deux tests tavelure pour la corrélation entre l'expression constitutive de PPO et l'efficacité du Bion® variant de -0,40 avec le test de 2017 à -0,10 avec le test de 2018. Nous pouvons observer un plus grand nombre de valeurs de corrélation positive intéressantes (0,37 pour Agg avec l'efficacité sur feu bactérien, 0,46 pour HMGR avec l'efficacité sur tavelure, 0,42 pour FPPS avec l'efficacité sur feu bactérien, 0,47 pour CAD avec l'efficacité sur tavelure et 0,47 pour Extensine avec la différence sur feu bactérien).

3.1-4. Validation du travail de design des amorces

Nous avons également analysé l'impact du design des amorces dans les zones non polymorphes à partir du pool des génotypes du sous-échantillon.

Prenons l'exemple de PR10, il s'agit d'une famille de gènes importante avec une quarantaine de séquences. Les amorces de la qPFD ont été dessinées sur la version du génome de Golden delicious. Elles ciblaient plusieurs séquences de la famille du gène. Sur le nouveau génome, la principale séquence ciblée par ce couple est MD13G1161100. Si nous regardons les résultats du test de ce couple d'amorces sur le pool (tableau 4), nous pouvons voir que, malgré une valeur de R² correct et 1 seul pic d'amplification, l'efficacité est de seulement 67 %.

Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques des amorces testées pour le gène d'intérêt PR10

	Gène ciblé	Amorce directe	Amorce inverse	Spécificité	Efficacité	R ²
PR10 (qPFD)	MD13G1161100	CCTGCTAGGTTGTACAATGCTCT	GTCAATTCATCAACCTTGTGCT	1 seul pic	67,60%	0,987
PR10 (couple 2)	MD16G1160700	GCAAACACTCATACGCCTACACT	GTGGTAGTGGCTGATACTCTTGATG	1 seul pic	89,70%	0,997
PR10 (couple 3)	MD16G1160700	GAACGAGTACACCTCTGAGATTCC	GGCCACCGTCTCCTTCAA	1 seul pic	97,80%	0,997

Cette valeur étant trop faible, plusieurs couples d'amorce ont été dessinés pour la famille. Par rapport à l'étude bibliographique et à la conception de l'arbre phylogénétique (annexe IV), la séquence MD16G1160700 a été choisie comme cible étant proche de deux références fonctionnelles. Les deux couples étudiés ont donné un résultat d'efficacité plus intéressant que les amorces de la qPFD avec 89% et 97%.

Si nous observons les alignements des séquences avec les amorces, nous pouvons voir que les amorces de la qPFD (figure 12) n'ont pas de SNP avec le génome de Golden delicious. Mais si on regarde la même séquence avec les ZNP, nous pouvons voir que la séquence de l'amorce directe se situe dans une zone polymorphe (indiquée par des N). A l'inverse, si nous regardons les nouveaux couples avec la séquence qu'ils ciblent (figure 12), toutes les amorces sont complètement alignées sur des zones non polymorphes.

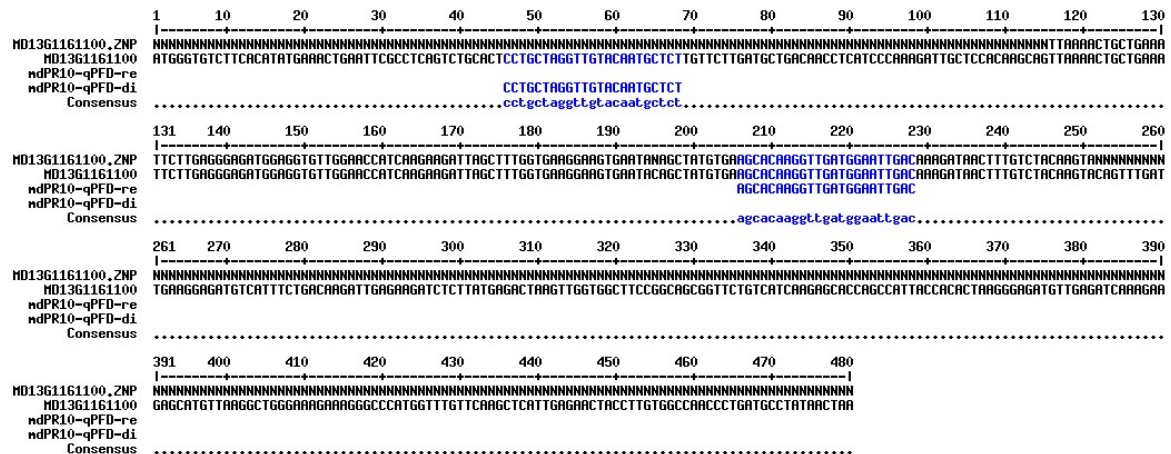


Figure 12 : Alignements des amorces de la qPFD pour PR10 avec la séquence du gène ciblé et la séquence ciblée avec les zones non polymorphes

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et efficacité des stimulateurs de défense des plantes

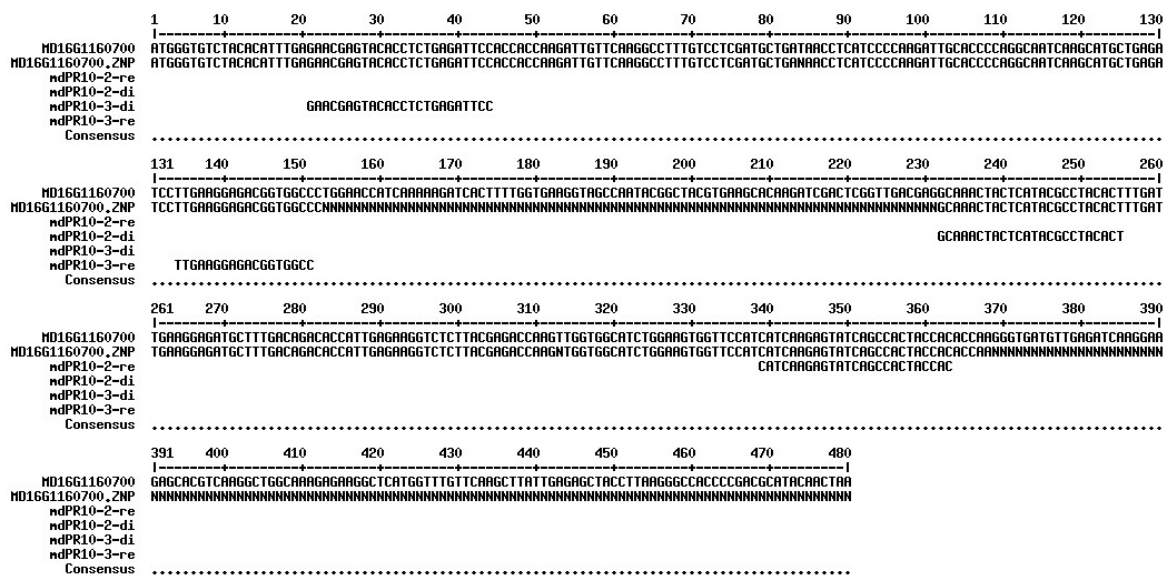


Figure 13 : Alignements des amorces designées 2 et 3 pour PR10 avec la séquence du gène ciblé et la séquence ciblée avec les zones non polymorphes

3.2- Analyse de l'expression constitutive des gènes de défenses de la population B avec le niveau de résistance aux bioagresseurs

3.2-1. Expression constitutive des gènes de défenses sur la population B

Afin de préciser les résultats d'expression constitutive des gènes, une nouvelle analyse a été menée sur la population B. Nous pouvons de nouveau observer sur les figures 14, 15 et 16, les 3 types de variations d'expression. Cependant nous pouvons observer une évolution de certains gènes dans une autre catégorie.

Nous retrouvons dans les gènes peu variables : APOX (figure 14), HMGR et CalS (annexe IX). Le gène FPPS (annexe IX), quant à lui présente un peu plus de variabilité. Il rejoint dans la catégorie intermédiaire CSL (figure 15) et CAD (annexe IX). Nous pouvons observer plus de gènes très variables avec Agg (figure 16), PR8, PR10, PPO et Extensine (annexe IX).

Là encore, certains génotypes présentent une variabilité d'expression importante entre leurs différents réplicats biologiques.

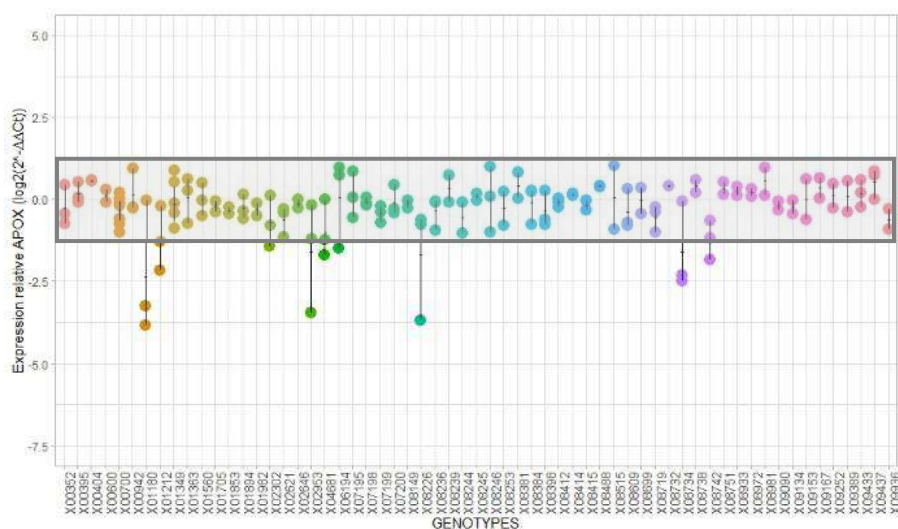


Figure 14 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène APOX ($\log_2(-\Delta\Delta C_t)$) pour les génotypes du sous-échantillon plus l'extension

Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et efficacité des stimulateurs de défense des plantes

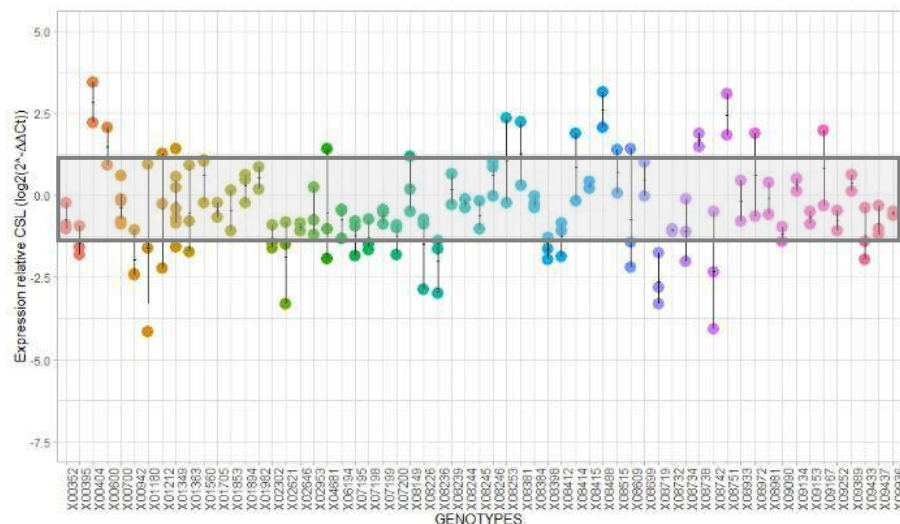


Figure 15 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène CSL ($\log_2(-\Delta\Delta Ct)$) pour les génotypes du sous-échantillon plus l'extension

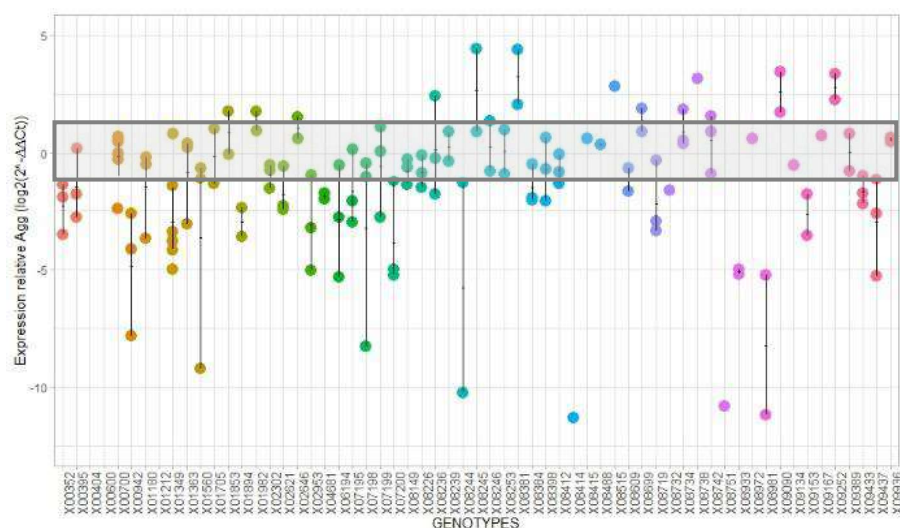


Figure 16 : Graphique de l'expression relative au niveau constitutif du gène Agg ($\log_2(-\Delta\Delta Ct)$) pour les génotypes du sous-échantillon plus l'extension

Pour les analyses statistiques (tableau 5), plus de gènes ont une variabilité d'expression significativement expliquée par le facteur « génotype » (PR10, Agg, PPO, HMGR, FPPS, CSL, APOX, CAD, CalS, Extensine). De plus, les valeurs de p-value sont plus petites que pour la population A, ce qui signifie que le facteur « génotype » de la population B explique plus significativement la variabilité d'expression avec l'ajout de génotype que la population A. Pour l'héritabilité, nous retrouvons PR10 avec un part génétique importante dans la variabilité de l'expression. Ensuite pour certains gènes l'ajout des 29 génotypes a permis d'augmenter leur valeur (Agg +0,37 et Extensine +0,54) alors que pour d'autres cela l'a diminué (APOX -0,1, CAD -0,08 et CalS -0,19). De manière générale, la valeur du coefficient de variation est plus importante chez les différents gènes. A l'exception de PR10 et CAD dont la dispersion a fortement diminué. Pour PR8, les valeurs des analyses statistiques n'ont pas évolué à part pour la moyenne de l'expression.

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats d'analyse de l'expression des gènes (sous-échantillon + extension)
Code significativité 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	PR8	PR10	Agg	PPO	HMGR	FPPS	CSL	APOX	CAD	CalS	Extensine
Significativité de la variabilité (p-value de l'ANOVA)		***	***	**	***	***	***	**	*	***	***
Héritabilité	0,00	0,80	0,74	0,43	0,52	0,70	0,70	0,41	0,31	0,62	0,69
Coefficient de variation génotypique	NA	179,54	-156,86	-51,25	121,26	40,19	-218,97	-158,75	128,79	49,42	-216,47
Moyenne d'expression	0,85	1,00	-1,24	-1,49	0,42	1,76	-0,31	-0,20	0,51	0,90	-0,30

3.2-2. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes de défenses de la population B avec le niveau de résistance aux bioagresseurs

Cette fois ci les corrélations (tableau 6) sont réalisées avec les tests de résistance de la Core Collection. Les corrélations surlignées en rouge sont cette fois-ci des corrélations négatives, car nous avons réalisé l'analyse avec les AUDPC des tests qui correspondent à une évaluation de du développement du pathogène. De ce fait lorsque les valeurs d'AUDPC sont élevées ça signifie que le pathogène a eu un développement important et donc que le génotype est sensible. Dans le tableau, lorsqu'il y a une corrélation négative cela signifie que plus l'AUDPC est bas plus l'expression du gène est élevée. Donc plus le génotype est résistant plus le gène est exprimé. Nous pouvons observer trois valeurs significatives. Il y a une valeur de corrélation négative de -0,26 pour APOX avec le feu bactérien. Il s'agit de la plus élevée des valeurs négatives. Pour les valeurs positives nous en avons deux qui sont significatives de 0,31 pour Agg et 0,27 pour FPPS avec la tavelure.

Tableau 6 : Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et la résistance au feu bactérien et à la tavelure

	PR8	PR10	Agg	PPO	HMGR	FPPS	CSL	APOX	CAD	CalS	Extensine
Corrélation Feu bactérien	-0,13	-0,07	0,16	-0,01	-0,18	0,05	-0,08	-0,26	0,08	-0,03	0,01
Corrélation Tavelure	-0,12	0,03	0,31	0,13	-0,13	0,27	0,08	-0,04	0,17	0,17	0,12

4. Discussion

4.1- Variabilité du niveau de résistance après application de Bion®

Tout d'abord la diversité de résistance observée lors des différents tests confirme la variabilité attendue entre les 32 génotypes.

La réduction de la dose de Bion® entre le test de 2017 et le test de 2018 de résistance à la tavelure a été concluante en permettant d'avoir des valeurs d'AUDPC plus importantes et un nombre de génotypes résistants en baisse (couverture de la sporulation maximum inférieure ou égale à 10% de la feuille au cours du test). Pour le feu bactérien, malgré une augmentation de la concentration du Bion® entre le test de 2018 et le test de 2019, nous avons pu observer que les valeurs d'AUDPC sont plus élevées avec une plus forte concentration du SDP. Or, nous nous attendions à obtenir une réduction de ces valeurs. Ces résultats s'expliquent par les conditions environnementales durant le test de 2019. En effet, nous savons que des températures supérieures à 21°C sont favorables au développement et à la croissance de la bactérie (Brisset, 2016) et lors du test de cette année une période de forte chaleur a eu lieu ce qui a favorisé le développement du pathogène par rapport à l'année dernière. Pour pouvoir tester pleinement l'impact du dosage du stimulateur sur la résistance au feu bactérien, il serait nécessaire de répéter le test avec des conditions environnementales plus proches de celles ayant eu lieu lors du test de 2018.

Il est important de noter la variabilité assez importante qui existe entre les copies de certains génotypes. Ceci, même si la réduction liée au traitement au Bion® est significative par rapport

au traitement à l'eau. Pour certains des génotypes nous avons pu observer une valeur d'écart-type plus importante que la valeur moyenne d'AUDPC. Il est possible que l'inoculation ait été hétérogène entre les individus et nous avons vu avec d'autres tests réalisés durant mon stage qu'il peut exister un gradient d'hétérogénéité dans les serres. Il serait intéressant d'approfondir l'analyse sur ce point pour évaluer s'il existe ou non un biais à ce niveau pour ces tests. Nous pouvons également pour les prochains tests mettre en place un dispositif expérimental prenant en compte le gradient d'hétérogénéité tel qu'un dispositif en split-plot. Ensuite ce phénomène peut être également dû à une différence de développement des plants et donc un état physiologique différent au moment de l'application du Bion® et/ou de l'inoculation du pathogène. Par exemple nous savons que la tavelure s'attaque surtout à de jeunes organes en développement. Ceci s'explique par la présence d'une résistance ontogénique chez les feuilles plus âgées (8 à 10 jours de développement en conditions contrôlées). En atteignant un certain âge les feuilles développent une résistance à l'inoculation et elles la perdent en automne (Soufflet-Freslon, 2008). De ce fait, si le plant que nous avons inoculé présente des feuilles assez âgées et pas de jeunes feuilles suffisamment développées pour correctement recevoir l'inoculum cela peut engendrer une variabilité entre les copies d'un même génotype. Pour limiter cet effet, il est important de prévoir suffisamment de plants greffés par génotype pour pouvoir choisir ceux qui se sont développés au maximum de la même manière pour le test. Cependant, cela reste limité pour certains génotypes présentant des difficultés de développement.

Pour la majorité des génotypes nous avons pu observer une diminution du développement des maladies avec l'utilisation du Bion®. Et surtout nous avons pu observer que certains génotypes, ayant le même niveau de résistance avec l'application d'eau, présentent une réaction différente à l'utilisation du SDP. Nous pouvons donc supposer qu'il existe un ou plusieurs facteurs intrinsèques aux génotypes qui engendrent cette différence de réponse. Par exemple nous pouvons envisager que la réponse immunitaire totale amène au même résultat mais qu'une des voies de défenses peut être complètement éteinte chez l'un des génotypes et ne s'exprime pas suffisamment chez l'autre. Le Bion® permettrait alors de développer la réponse faible en stimulant la plante avant l'attaque du bioagresseur mais ne permet pas la correction de la voie éteinte à la suite d'un défaut dans le patrimoine génétique du génotype.

Il s'agit maintenant de savoir si l'expression au niveau constitutif des gènes que nous avons étudiés peut amener un début d'explication par rapport à cette variabilité comme cela est supposé dans l'énoncé de l'hypothèse du projet PREDIRE.

4.2- Variabilité du niveau d'expression constitutive d'un panel de gènes de défenses

Par rapport au nombre important de génotypes étudiés dans la Core Collection et à la variabilité génétique importante du pommier, le choix des amorces s'avère être un point très important. En effet les amorces doivent s'hybrider sur l'ensemble des 400 génotypes pour que nous puissions avoir le maximum d'information. Nous pouvons voir avec le couple d'amorce pour le gène PR10 de la qPFD que l'utilisation d'une amorce se trouvant dans une zone polymorphe réduit de manière importante l'efficacité de cette dernière sur le pool génétique. Nous pouvons supposer que si nous l'utilisons sur les échantillons d'ADNc des génotypes, certains ne répondraient pas du tout et d'autres pourraient donner des résultats non fiables. Surtout que nous n'avons aucun moyen de savoir ce qu'il en sera vis-à-vis de l'expression obtenue. De plus si nous considérons les deux couples dessinés pour le projet, on peut là encore voir une différence d'efficacité de presque 10% même si les deux sont corrects (tableau 4). Donc même en se plaçant dans des zones non polymorphes il est important de tester plusieurs couples pour pouvoir obtenir des résultats les plus fiables possibles.

Pour ce qui est des RT-qPCR, il existe bien une variation d'expression de gènes de défenses au niveau constitutif entre les géotypes. Plusieurs gènes ont une variabilité significative et intéressante pour le projet avec un coefficient de variation élevé et une héritabilité supérieure à 0,5. Nous pouvons notamment retenir les gènes PR10, Agg, HMGR, FPPS et CSL ayant un rôle dans la mise en place des barrières chimiques et les gènes CalS et Extensine pour les barrières physiques. De plus, il est intéressant de noter que l'augmentation du nombre de géotypes a permis d'augmenter les valeurs d'analyse sur la variabilité et de faire ressortir plus de gènes. Cependant cette augmentation est élevée pour les gènes Agg et Extensine qui avait une héritabilité inférieure à 0,5 avec les analyses de la population A.

Après analyse des résultats, les valeurs de coefficient de variation ne sont pas utilisables pour analyser notre jeu de données. Nous le voyons aux valeurs très élevées dû à une moyenne d'expression proche de 0 (par exemple PR10 sur la population A avec une moyenne de 0,04 et un CVg de 2243,90) ou encore au valeur négative. Ceci s'explique par le choix du calibrateur lors du calcul des expressions à partir des données de Cq. Nous avons utilisé un même géotype comme calibrateur (X00700) pour tous les gènes or pour pouvoir utiliser le CVg nous aurions dû choisir le géotype le moins exprimé pour toujours placer notre valeur 0 au plus faible. Ainsi nous aurions eu uniquement des données positive et des moyennes non proches de 0.

Ensuite là encore, nous avons pu observer de la variabilité intra-géotype (entre les différentes copies biologiques d'un géotype). Celle-ci peut s'expliquer par la quantité très importante d'échantillons à traiter dans ce projet. Les nombreuses étapes de préparation peuvent entraîner de la variabilité entre les échantillons. En effet, entre le stade physiologique au moment des prélèvements, les extractions, la RT et la qPCR, des petites variations au cours d'une de ces étapes ont pu entraîner un écart d'expression entre les copies biologiques surtout que ces étapes ont été réalisées par plusieurs personnes et sur plusieurs jours. Il existe donc forcément malgré l'utilisation de protocoles identiques des effets manipulateurs et d'environnement.

4.3- Corrélation entre les niveaux de résistance, d'efficacité du Bion® et d'expression constitutive de gènes de défenses

4.3-1. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et l'efficacité du Bion®

Si nous nous intéressons maintenant à la corrélation entre l'expression des gènes au niveau constitutif et la différence eau-Bion® ou l'efficacité du Bion®, nous n'avons observé que peu de corrélation significative et elles le sont uniquement avec le feu bactérien. Les expressions du gène Agg et du gène CalS sont significativement corrélées à l'efficacité du Bion®

La meilleure corrélation est entre l'expression de CalS et l'efficacité du Bion®. Ce gène semble prometteur et ce lien semble logique. En effet, nous savons que la bactérie pénètre dans les cellules et se propage par les vaisseaux conducteurs. Or, le gène CalS joue un rôle dans la modification pariétale avec l'accumulation de callose dans les parois, ce qui crée une barrière physique au développement de la bactérie (de Bernonville, 2009; Musetti et al., 2010). Nos résultats tendent à montrer que les plantes qui expriment de manière importante ce gène au niveau constitutif présentent une meilleure efficacité du Bion®. Nous pouvons supposer que la stimulation engendrée par le Bion® augmente encore plus l'expression du gène CalS lors de l'induction, ce qui permet à la plante de synthétiser encore plus de callose ou bien plus rapidement qu'une plante dont l'expression est moins importante de base. Cela permettrait donc de limiter la progression du pathogène plus efficacement. Cependant il est vrai que la valeur de corrélation est suffisamment élevée (supérieur à 0,5) pour pouvoir parler de corrélation, mais elle n'est pas non plus très importante par rapport au celle de 80% qui a pu être évaluée sur le riz (Vergne et al., 2010). Aux vues des résultats obtenus entre nos deux tests de résistance au feu bactérien et à la variabilité des corrélations, il serait néanmoins nécessaire de répéter le test

avec la même concentration de Bion®. Ceci pour pouvoir évaluer la répétabilité de ces résultats et pouvoir avancer dans la réflexion de manière objective.

Avec les analyses de corrélations entre l'expression constitutive et les tests de résistance à la tavelure, nous avons pu observer que malgré une augmentation des valeurs d'AUDPC avec la concentration plus faible de Bion® les corrélations s'avèrent moins intéressantes en positif comme en négatif (valeur inférieure ou égale à 0,32). En effet les corrélations significatives et dont les valeurs sont les plus élevées ont été calculées avec le premier test, celui où le Bion® a été appliqué avec la concentration 0,4g/L. Ce phénomène a également été perçu pendant nos analyses. En effet aux vues des résultats de corrélations faibles nous avons retiré de l'analyse les génotypes résistants que nous avons supposés tirer les résultats vers le bas. Cependant cela n'a pas été concluant, au contraire les résultats obtenus ont été encore plus faibles. Il semblerait que la corrélation entre le niveau de résistance et l'expression constitutive des gènes soit plus expliquée par les variabilités dans les génotypes résistants que par celles dans les génotypes sensibles.

4.3-2. Corrélation entre l'expression constitutive des gènes d'intérêt et la résistance au feu bactérien et à la tavelure

Pour ce qui est des analyses entre l'expression des gènes et la résistance aux bioagresseurs, nous n'avons pas observé de valeurs de corrélation permettant de conclure à une corrélation. Elles sont toutes assez basses en négatif comme en positif avec des valeurs inférieures ou égales à 0,31 et cela même si nous avons quelques valeurs significatives.

La seule valeur allant vers notre hypothèse de prédiction (résistance élevée lorsque l'expression est élevée) est celle obtenue pour le gène APOX avec le feu bactérien. Cependant si nous regardons les résultats de l'expression ce gène s'avère peu variable entre les génotypes et avec l'augmentation du nombre de génotypes l'étendue de la variation est plus importante mais l'héritabilité a diminué.

Pour la résistance à la tavelure nous n'avons pas observé de corrélation avec la résistance mais certaines valeurs tendent vers une corrélation avec la sensibilité. L'expression des gènes Agg et FPPS pourrait être plus importante quand la sensibilité à la tavelure du pathogène est élevée.

Aux vues des résultats lors des analyses nous avons voulu tester l'utilisation de groupes de sensibilité comme cela a été fait pour les analyses chez le riz entre l'expression constitutive des gènes de défenses et la résistance au champignon *Magnaporthe oryzae*. L'objectif étant de voir si en regroupant l'information sur la résistance en groupe nous pouvions clarifier le possible lien avec l'expression constitutive des gènes en visualisant une tendance similaire entre l'augmentation de la résistance et l'augmentation de l'expression du gène. Cela n'a pas été concluant et confirme l'absence de corrélation nette entre le niveau de résistance et l'expression constitutive des gènes.

Dans tous les cas les valeurs de corrélation sont trop faibles pour pouvoir réellement conclure à une corrélation entre l'expression au niveau constitutif et le niveau de résistance au feu bactérien ou à la tavelure. Les résultats obtenus sur ces populations ne nous permettent donc pas de valider notre hypothèse de départ sur le panel de gènes étudiés.

5. Conclusion et perspectives

L'objectif du projet PREDIRE dans lequel s'insère mon stage est de voir s'il existe une variabilité de l'expression constitutive de gènes de défenses du pommier qui permettrait d'expliquer et de prédire la variabilité de résistance observable face aux bioagresseurs et l'efficacité de stimulateur de défenses des plantes. Pour avancer sur cette réflexion, mon travail

a porté sur l'étude de deux populations de génotypes par rapport à l'efficacité du Bion® pour la population A et par rapport à la résistance au feu bactérien et à la tavelure pour la population B. Les résultats obtenus sont mitigés avec une corrélation prometteuse pour l'efficacité du Bion® mais pas de résultats concluant pour les corrélations avec le niveau de résistance sur le panel de gènes étudiés.

Nous avons pu observer une variabilité d'expression au niveau constitutif pour certains des 11 gènes de défenses étudiés et une variabilité dans l'efficacité du Bion® pour des génotypes ayant le même niveau de résistance à la tavelure et au feu bactérien avec l'application d'eau. Ces variabilités ont posé des bases pertinentes et prometteuses pour la suite des analyses avec les corrélations.

Nous avons ensuite obtenu une corrélation prometteuse entre le niveau d'expression du gène CalS, impliqué dans la synthèse de la callose et l'efficacité du Bion® face au pathogène *Erwinia amylovora* responsable du feu bactérien. Cependant, ces résultats ont été obtenus sur le test 2019 où le développement du pathogène a été renforcé par une vague chaleur. Ils sont donc à confirmer avec un autre test avec des conditions environnementales plus contrôlées. Pour les autres analyses de corrélation, les résultats obtenus ne nous permettent pas de valider notre hypothèse de départ. Cependant cela ne signifie pas que notre hypothèse est fausse. En effet nos analyses ont porté uniquement sur 11 gènes de défenses, il en existe bien plus. Ensuite pour chacun de ces gènes nous avons pu voir qu'il existe plusieurs séquences dans le génome du pommier. Nous avons donc pu choisir des séquences qui ne sont pas corrélées, ce qui ne signifie pas qu'aucune des séquences de la famille ne l'est. Il est à noter également que la fonctionnalité de ces séquences n'est pas toujours vérifiée et nécessiterait de faire l'objet d'un autre projet pour la caractériser.

Ensuite nous avons pu observer que l'augmentation du nombre de génotypes dans les analyses a modifié certaines tendances. Nous pouvons donc supposer que cela sera également le cas avec l'ensemble des génotypes de la Core Collection. De ce fait nous avons sélectionné trois gènes par rapport à des résultats préliminaires non présentés dans ce mémoire pour les étudier sur la Core Collection. Il s'agit du gène PR10 présentant la variabilité d'expression la plus élevée, et des gènes Agg et PPO sur lesquels l'équipe ResPom travaille dans d'autres projets. Ces gènes ont déjà été passés en qPCR et les résultats sont en cours d'analyse.

Des résultats concluants dans la suite des analyses, où sur d'autres gènes, serait une plus-value vraiment intéressante pour la filière pomme surtout dans le contexte actuel de la réduction des produits phytopharmaceutiques. En effet, cela pourrait permettre d'orienter la sélection et de faciliter le tri au niveau des descendants avec une simple analyse de l'expression d'un ou plusieurs gènes et donc de sélectionner des génotypes productifs capables de lutter seuls contre certains pathogènes. Nous pouvons également imaginer une sélection tournée vers des génotypes répondant le plus efficacement possible à certain stimulateur de défenses et ainsi rendre l'utilisation de ces derniers plus efficaces en verger avec des arbres très réceptifs à ces produits. Dans tous les cas, cela permettra de réduire la consommation en produits phytopharmaceutiques de la filière et de ce fait rendra la production de pomme plus durable.

Bibliographie

Liste bibliographique

Agreste, 2019. Statistique agricole annuelle 2017-2018.

Belete, T., Boyraz, N., Srivastava, S., 2017. Critical Review on Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Biology, Epidemiology, Economic Importance, Management and Defense Mechanism to the Causal Agent. *Journal of Plant Physiology & Pathology* 05. doi:10.4172/2329-955X.1000166

Benhamou, N., Rey, P., 2012. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection* 92, 1–23. doi:https://doi.org/10.7202/1012399ar

Best, D.J., Roberts, D.E., 1975. Algorithm AS 89: The Upper Tail Probabilities of Spearman's Rho. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 24, 377–379. doi:10.2307/2347111

Bowen, J.K., Mesarich, C.H., Bus, V.G.M., Beresford, R.M., Plummer, K.M., Templeton, M.D., 2011. *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab: *Venturia inaequalis*. *Molecular Plant Pathology* 12, 105–122. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00656.x

Carisse, O., McFadden-Smith, W., Meloche, C., Lasnier, J., 2006. La tavelure du pommier: mieux comprendre pour mieux intervenir. Agriculture et agroalimentaire Canada, Ottawa.

Chevalier, M., Lespinasse, Y., Renaudin, S., 1991. A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* 40, 249–256. doi:10.1111/j.1365-3059.1991.tb02374.x

Cooper, J.I., 1983. Responses of Plants to Viruses: Proposals for the Use of Terms. *Phytopathology* 73, 127. doi:10.1094/Phyto-73-127

Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881–10890. doi:10.1093/nar/16.22.10881

Cretin, L., Triquenot, A., 2018. Apports de produits phytopharmaceutiques en arboriculture : nombre de traitements et indicateur de fréquences de traitements (Dossier No. 43). Agreste - SSP Bureau des statistiques végétales et animales.

Croxall, H.E., Gwynne, D.C., Jenkins, J.E.E., 1952. The Rapid Assessment of Apple Scab on Fruit. *Plant Pathology* 1, 89–92. doi:10.1111/j.1365-3059.1952.tb00038.x

de Bernonville, T.D., 2009. Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, et le pommier (*Malus x domestica*). Université d'Angers.

Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., Blanc, G., 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology* 10, 8. doi:10.1186/1471-2148-10-8

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* 36, W465-469. doi:10.1093/nar/gkn180

Duan, N., Bai, Y., Sun, H., Wang, N., Ma, Y., Li, M., Wang, X., Jiao, C., Legall, N., Mao, L., Wan, S., Wang, K., He, T., Feng, S., Zhang, Z., Mao, Z., Shen, X., Chen, Xiaoliu, Jiang, Y., Wu, S., Yin, C., Ge, S., Yang, L., Jiang, S., Xu, H., Liu, J., Wang, D., Qu, C., Wang, Y., Zuo,

- W., Xiang, L., Liu, C., Zhang, D., Gao, Y., Xu, Y., Xu, K., Chao, T., Fazio, G., Shu, H., Zhong, G.-Y., Cheng, L., Fei, Z., Chen, Xuesen, 2017. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communications* 8, 249. doi:10.1038/s41467-017-00336-7
- Durel, C.-E., Brisset, M.-N., Aubourg, S., Gardet, R., 2016. PREDIRE : Constitutive level of basal defences in healthy apple cultivars as predictors of multi-resistance and performance plant defence stimulators.
- Faessel, L., Gomy, C., Nassr, N., Tostivint, C., Hipper, C., Dechanteloup, A., 2014. Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes - Etude des connaissances disponibles et recommandations stratégiques (Rapport final).
- Flor, H.H., 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275–296. doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001423
- FranceAgriMer, 2019. Fiche filière - FRUITS FRAIS.
- FranceAgriMer, 2017. Bilan de campagne : La pomme en 2016-2017.
- Hollander, M., Wolfe, D.A., Chicken, E., 2013. *Nonparametric Statistical Methods*, 3rd Edition.
- Interfel, Anifelt, 2017. Plan de filière fruits et légumes.
- Kruijer, W., Boer, M.P., Malosetti, M., Flood, P.J., Engel, B., Kooke, R., Keurentjes, J.J.B., van Eeuwijk, F.A., 2015. Marker-Based Estimation of Heritability in Immortal Populations. *Genetics* 199, 379–398. doi:10.1534/genetics.114.167916
- Laloi, G., 2016. Etude du pyramidage de résistances quantitatives du pommier à la tavelure. Université d'Angers.
- Lassois, L., Denancé, C., Ravon, E., Guyader, A., Guisnel, R., hibrand-saint Oyant, L., Poncet, C., Lasserre-Zuber, P., Feugey, L., Durel, C.-E., 2016. Genetic Diversity, Population Structure, Parentage Analysis, and Construction of Core Collections in the French Apple Germplasm Based on SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 34. doi:10.1007/s11105-015-0966-7
- Leforestier, D., 2015. Localisation de régions du génome du pommier contrôlant la variation de caractères de qualité du fruit et de résistance aux maladies : signatures de sélection et génétique d'association (thesis). Angers.
- Marolleau, B., Staub, J., Barrière, Q., Indiana, A., Gravouil, C., Chartier, R., Heintz, C., Devaux, M., Tharaud, M., Paulin, J.-P., Dugé de Bernonville, T., Brisset, M.-N., 2013. La qPFD, un outil de criblage des SDP alias stimulateurs de défense des plantes. *Phytoma* 664, 42–45.
- Ministère de la Transition écologique et solidaire, 2018. Plan écophyto II+.
- Musetti, R., Paolacci, A., Ciaffi, M., Tanzarella, O.A., Polizzotto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora, P., Badiani, M., Osler, R., 2010. Phloem Cytochemical Modification and Gene Expression Following the Recovery of Apple Plants from Apple Proliferation Disease. *Phytopathology* 100, 390–399. doi:10.1094/PHYTO-100-4-0390
- OEPP/EPPO, 2013. PM 7/20 (2)* *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin* 43, 21–45. doi:10.1111/epp.12019
- OEPP/EPPO, n.d. Fiche informative sur les organismes de quarantaine - *Erwinia amylovora* 7.

Owczarzy, R., Tataurov, A.V., Wu, Y., Manthey, J.A., McQuisten, K.A., Almabrazi, H.G., Pedersen, K.F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N.O., Sailor, C.A., Dawson, R.B., Peek, A.S., 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research* 36, W163–W169. doi:10.1093/nar/gkn198

Pajot, E., Fayot, B., 2019. Stimulation des Défenses Naturelles des plantes. *ALTER AGRI* 23–26.

Soufflet-Freslon, V., 2008. Résistance du pommier à la tavelure (*Venturia inaequalis*): Recherche de nouveaux loci et construction de géotypes “prototypes” en vue d’une gestion durable de la résistance. Université d’Angers.

Tripathi, D., 2010. Role of SABP2 in Systemic Acquired Resistance Induced by Acibenzolar-S-Methyl in Plants.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034.1. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Nottéghem, J.-L., 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, 206. doi:10.1186/1471-2229-10-206

Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer.

Liste sitographique

AgriOrbit, 2018. Global apple consumption continues to grow [WWW Document]. AgriOrbit. URL <https://www.agriorbit.com/global-apple-consumption-continues-to-grow/> (accessed 8.23.19).

Brisset, M.-N., 2016. *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. Feu bactérien des pomoidées [WWW Document]. URL <http://ephytia.inra.fr/fr/C/21775/Di-gno-Pom-Erwinia-amylovora-feu-bacterien> (accessed 8.19.19).

Didelot, F., Giraud, M., Caffier, V., 2018. *Venturia inaequalis* (tavelure du pommier) [WWW Document]. URL <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20846/Di-gno-Pom-Venturia-inaequalis-tavelure-du-pommier> (accessed 8.19.19).

Ecophyto Pro, 2017. Les produits phytopharmaceutiques : statut et mise en marché - Ecophyto PRO : réduire et améliorer l’utilisation des phytos [WWW Document]. URL https://www.ecophyto-pro.fr/fiches/fiche/23/les_produits_phytopharmaceutiques_statut_et_mise_en_marche/n:304 (accessed 9.10.19).

EcophytoPIC, n.d. Les bioagresseurs [WWW Document]. URL <http://www.ecophytopic.fr/arbo/surveillance/les-bioagresseurs> (accessed 9.10.19).

Elicitra, 2019. Définition des SDP [WWW Document]. URL https://www.elicitra.org/index.php?rub=definition_des_sdp (accessed 8.21.19).

ENS Lyon, n.d. Présentation RT PCR [WWW Document]. URL http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/rtpcr/rtpcr02.htm (accessed 8.19.19a).

- ENS Lyon, n.d. Définition de différents types de gènes [WWW Document]. URL <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/glossary/g.htm#G11> (accessed 9.3.19b).
- FAO, 1995. Glossaire des termes phytosanitaires [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/3/W3587E/w3587e02.htm> (accessed 9.10.19).
- FREDON PACA, 2018. Feu bactérien [WWW Document]. URL <http://www.fredonpaca.fr/Feu-bacterien.html> (accessed 8.19.19).
- GIE-FPSO, 2014. Erwinia amylovora (feu bactérien) [WWW Document]. URL <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19559/VigiHorti-Erwinia-amylovora-feu-bacterien> (accessed 8.19.19).
- INRA, 2018. Malus pumila: Les maladies et ravageurs [WWW Document]. URL <http://ephytia.inra.fr/fr/C/18051/Hypp-encyclopedie-en-protection-des-plantes-Les-maladies-et-ravageurs> (accessed 9.9.19).
- Léveillé, P., 2016. Les plantes font de la résistance [WWW Document]. URL <http://www.inra.fr/%2FGrand-public%2FGenetique%2FTous-les-magazines%2FMecanismes-de-resistance-des-plantes-aux-maladies> (accessed 8.26.19).
- Léveillé, P., 2011. Du gène au verger, protéger le pommier de la tavelure [WWW Document]. URL <http://www.inra.fr/%2FGrand-public%2FSante-des-plantes%2FToutes-les-actualites%2FProtger-le-pommier-de-la-tavelure> (accessed 8.19.19).
- Mission communication INRA, 2013. Ressources végétales [WWW Document]. URL <http://institut.inra.fr/%2FOrganisation%2FDispositifs-et-infrastructures%2FTous-les-dossiers%2FRessources-genetiques-et-biologiques%2FVegetales%2F%28key%29%2F0> (accessed 9.10.19).
- OEPP/EPPO, 2018. EPPO A2 List of pest recommended for regulation as quarantine pests [WWW Document]. URL https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list (accessed 8.21.19).
- Oswald, N., 2015. What Is a Cq (Ct) Value? [WWW Document]. Bitesize Bio. URL <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/> (accessed 9.3.19).
- Perraut, A., 2011. - qPFD - : Un dispositif original de criblage et d'évaluation de molécules à effet « Stimulateur de Défense Naturelle » des plantes [WWW Document]. URL <http://www.inra.fr/%2FEntreprises-Monde-agricole%2FOffres-de-technologie%2FToutes-les-actualites%2FqPFD> (accessed 9.3.19).
- Roby, D., Raffaele, S., 2016. Immunité quantitative chez les plantes [WWW Document]. URL <https://www6.toulouse.inra.fr/lipm/Recherche/Immunit-quantitative-chez-les-plantes> (accessed 8.19.19).
- Syngenta, 2019. BION 50 WG [WWW Document]. Syngenta France. URL <https://www.syngenta.fr/produits/protection-des-cultures/fongicides/bion-50-wg> (accessed 8.21.19).

Annexes

Annexe I : Numéro d'accension et nom des génotypes du sous-échantillon, de l'extension et des témoins des tests

Sous-échantillon de 32 génotypes		Extension de 29 génotypes	
X00352	Pomme Blanche d'Été	X00404	Camuesa Verde
X00700	Eri Sagarra	X00600	Choureau
X00942	Pomme Orange	X01705	Bastien
X01180	Reinette de Multhaupt	X01853	Charles Ross
X01212	Châtaignier	X01982	Calville de Mleiev
X01349	Roxbury Russet	X02646	Beacon
X01363	Calville d'Août	X08239	Entzea Sagarra
X01560	Gascogne Scarlet	X08244	Pouzaraque
X01894	Romarin Blanc	X08245	Baguette Violette
X02302	Reinette Bergamotte	X08253	Lambron
X02621	Discovery	X08381	Cagarlaou
X02953	Rose Douce	X08414	Rouget
X04681	Fiesta	X08415	Teton de Demoiselle
X04712	Gala	X08488	Ruban
X06194	Barbe	X08515	Melba
X07195	Pomme Cloche	X08699	Belle-Fleur de Saint-Benoit
X07198	Reinette de Champagne	X08732	Reinette de Bordeaux
X07199	Rose de Berne	X08738	Reinette de Pluvigné
X07200	Transparente Blanche	X08751	Vernade
X08149	Minnesota Crunch	X08933	Baguette d'Été
X08226	Vedette du Béarn	X08972	Merveille de Vitry
X08236	Saint Michel	X08981	PI 633799.E
X08246	Gueule de Mouton	X09090	La Longue
X08384	Carmignole Musquée	X09134	Vigne Royale
X08398	Margil	X09153	Pomme de Puits
X08412	Reinette Thouin	X09167	Pomme de Dolomieu
X08609	Reinette Marbrée de Luzoir	X09252	Cabarelle
X08719	George Carpenter	X09389	Calville Rouge des Vignes
X08734	Reinette de Geer	X09936	Indo
X08742	Reinette Simirenko		
X09433	Maiapfel		
X09437	Gewurtzluiken		

Témoins pour les tests de résistance	
X00922	Idared
X00972	Golden
X02369	Evereste
X04712	Gala

Annexe II : Protocole d'extraction d'ARN

	Institut de Recherche en Horticulture et Semences Centre INRA Angers-Nantes, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé	Ref : IRHS-MO-(type d'activité)-0001
	Extraction d'ARN de feuilles de pommier avec le kit NucleoSpin® RNA Plant de MN	Version : A Date de création : 10/03/2017 Page : 1 sur 1

Réf: IRHS-T-0001 / Version: A / Date de création: 24/03/2015

Broyer les échantillons 2 fois 25 secondes à 30Hz, repasser à l'azote et le faire une seconde fois si nécessaire.

Préparation du buffer de lyse des cellules, faire un pré-mix avec 700µL de RAP + PVP40 4 % (soit 400 mg pour 10 ml) + β-mercapto 1 % (7 µl pour 700 µL), bien resuspendre !!!

ATTENTION : la suite du protocole s'effectue à température ambiante et sous sorbonne

Pour 1 échantillon :

ajouter 700µL du mélange ci-dessus et vortexer côté « fond » et côté « bouchon » jusqu'à décongélation

Laisser sur le portoir incuber pendant 15 minutes puis vortex à fond

Centrifuger 1 min à 5000g



Récupérer la phase aqueuse (~650 µL) et la déposer sur colonne violette annotée sur colonne et sur le côté

Centrifuger 1 min à 11000 g

Ajouter 650 µL d'éthanol 70° et homogénéiser par pipettage (au moins 10 fois)

Transférer le tout sur les colonnes bleues + tubes collecteurs préparés en 2 fois

Centrifuger 1 min à 11000 g

Ajouter 350 µL de MDB (Membrane Desalting Buffer)

Centrifuger 1 min à 11000 g

Préparer le mix rDNase, faire un pré-mix en prévoyant par échantillon : 10 µL de rDNase + 90 µL de Reaction Buffer for rDNase

Ajouter 95 µL du mix rDNase bien au centre de la colonne et incuber 30 min à température ambiante

Rincer la colonne avec 200 µL de RAW2 (inactivation de la rDNase)

Centrifuger 1 min à 11 000 g

Ajouter 600 µL de Buffer RA3

Centrifuger 1 min à 11 000 g

Ajouter 250 µL de buffer RA3

Centrifuger 1 min à 11 000 g

Placer les colonnes sur les tubes pour l'éluat (1.5mL)

Eluer les ARNs avec 30 µL d'eau RNase free fournie dans le kit (à 55°C)

Laisser incubé 1 min

Centrifuger 1 min à 11 000 g


Pour concentrer on récupère l'éluat et on le repasse sur la colonne avec une centri 1min à 11 000g

Jeter la colonne

Doser les ARNs au Nanodrop (400-2000 ng/µL attendu)

Rédigé ou révisé le :	Vérifié le :	Approuvé le
Par	Par	Par :
Visa :	Visa :	Visa :

Annexe III : Protocole de transcription inverse et PCR de vérification

	Mode opératoire	Réf : FB-MO-BM-05
	RT et PCR	Version 1 date : 21/01/09 page 1/2

1. Documents de référence

2. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

3. Hygiène et sécurité

4. Principe de la méthode

Synthèse des premiers brins d'ADN complémentaires aux brins d'ARN et amplification

5. Matériels nécessaires

- Deux bain-marie à 42°C et à 75°C ou thermocycleur pour la RT
- Thermocycleur pour la PCR
- Eau ultrapure stérile (UPS) en petits flacons (30 ml), à conserver à 4°C. Ouverture d'un flacon au minimum par semaine
- Barrettes et capuchons, embouts jaunes et blancs stérilisés 2 fois

6. Réactifs (chimiques et biologiques)

- dNTP (2,5 mM chacun) (set de Promega, référence U1240)
Qsp 100 µl :

2,5 µl de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à 100 mM	
90 µl d'eau UPS	
- Amorces
Solutions mères à 100 µM : diluer X nmoles lyophilisées dans 10X µl d'eau UPS
Solutions à 10 µM : diluer au dixième les solutions mères dans de l'eau UPS (qsp 100 µl)
Conserver à -20°C (voire à -80°C pour les SM)
- Oligo dT15
Solution à 0,5 µg/µl aliquotée en tubes de 50 µl (oligo Eurogentec)

7. Contraintes de la méthode

- Conditions RNase-free jusqu'à synthèse du brin d'ADNc (port de gants, tubes et embouts stérilisés 2 fois)

8. Contenu du mode opératoire

Reverse Transcription (RT)

1) Accrochage de la queue polyT :

Préparer un thermocycleur à 75°C (pgm 5 mn à 75°C, ∞ à 4°C) ou un bain-marie à 75°C, puis préparer le mix suivant pour n+1 échantillons :

Qsp 10 µl :

9 µl d'eau UPS	
1 µl oligo dT15	

Répartir le mix dans des barrettes stériles (10 µl/tube) et rajouter dans chaque tube 4 µl d'ARN (solutions à 0,5 µg/µl). Bien mélanger, centrifuger qqs secondes. Incuber 5 mn à 75°C, puis 5 mn dans la glace. Pendant ce temps, passer au point 2.

2) Transcription :

Préparer un thermocycleur à 42°C (pgm 75 mn à 42°C, ∞ à 4°C) ou un bain-marie à 42°C puis préparer le mix suivant pour n+1 échantillons :

Qsp 16 µl :

4,3 µl d'eau UPS	
6 µl de buffer M-MLV RTase (5X)	
5 µl de dNTP RNase free (2,5 mM chacun)	
0,7 µl de M-MLV RTase (Promega, 200 U/µl)	

Rédacteurs : M.N. Brisset, I. Pontais, C. Heintz, S. Cesbron

	Mode opératoire	Réf: FB-MO-BM-05 Version 1 date : 21/01/09 page 2/2
	RT et PCR	

Répartir le mix dans les barrettes venant du point 1 (16 µl/tube, 30 µl final). Bien mélanger, centrifuger qq secondes. Incuber 75 mn à 42°C

- 3) Faire des dilutions au 1/4 des produits RT dans des tubes PCR (500 µl) avec par exemple 10 µl de produits RT pour 30 µl d'eau UPS (dépend du nb de gènes à étudier par la suite)
- 4) Stocker les produits RT/4 et le reste des produits RT à -20°C

PCR

- 1) Préparer le mix suivant pour n+1 échantillons :

Qsp 38 µl :	25,5 µl d'eau ultrapure stérile 8 µl de buffer Taq (5X) 2,4 µl de MgCl ₂ 25 mM 1 µl de dNTP (2,5 mM chacun) 0,5 µl de l'amorce directe (10 µM) 0,5 µl de l'amorce reverse (10 µM) 0,1 µl de Taq (GoTaq Flexi Promega)	ou qsp 19 µl :	12,8 µl d'eau ultrapure 4 µl de buffer Taq (5X) 1,2 µl de MgCl ₂ 25 mM 0,5 µl de dNTP 0,25 µl de l'amorce directe 0,25 µl de l'amorce reverse 0,05 µl de Taq
-------------	--	----------------	---

Répartir le mix dans des tubes PCR, barrettes ou plaques, et rajouter l'ADNc ou l'ADN :

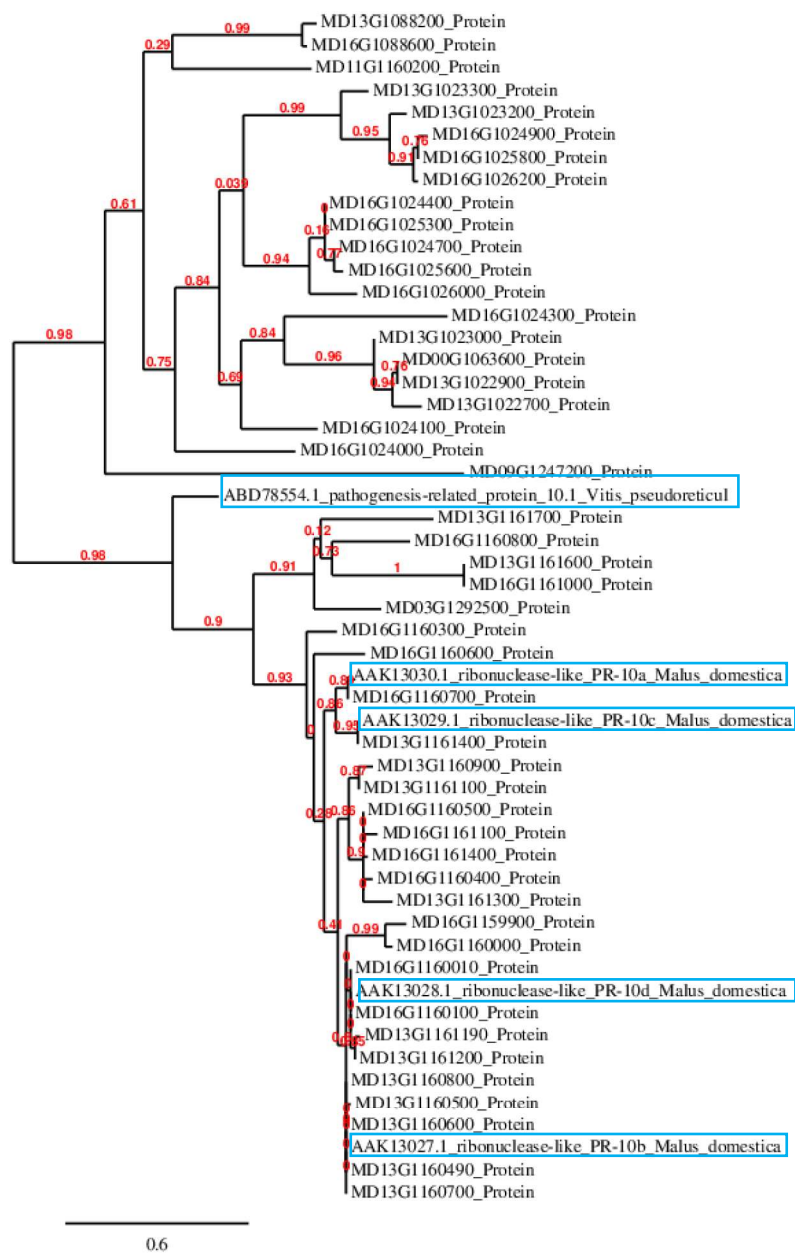
- 2 (ou 1) µl de produits RT ou de suspensions bactériennes (en mélangeant bien avec la pipette). NB : les suspensions bactériennes doivent avoir une concentration comprise entre 10⁷ et 10⁸ (pas plus) et doivent être préparées à partir de cultures fraîches ; elles sont soit utilisées immédiatement, ou congelées pour PCR ultérieures ; une bouillaison pendant 10 mn suivi d'un passage dans la glace peut favoriser la libération de l'ADN.
 - ou encore en agitant dans le puits PCR la pointe d'un cône jaune ayant préalablement effleuré la culture bactérienne. NB : ne pas en mettre trop sinon inhibition possible de la PCR.
- 2) Lancer la PCR avec le programme type suivant :

5 mn à 95°C (dénaturation totale)	
n cycles de	45 sec à 95°C (dénaturation),
	45 sec à X°C (hybridation des amorces),
	1 mn 15 sec à 72°C (élongation)
15 mn à 72°C (élongation finale)	
∞ à 15°C	

NB : T° optimales d'hybridation des amorces EF : 53°C (ne pas dépasser 55°C) ; des amorces Sp6 ou T7 : 56°C

Conservier les produits PCR à 4°C jusqu'à leur séparation sur gel


Annexe IV : arbre phylogénétique de la famille Bet v1, Mal d1 (PR-10)



Arbre réalisé avec le logiciel en ligne Phylogeny® (géré par Sebastien Santini - CNRS/AMU IGS UMR7256, référence : Dereeper et al., 2010, 2008)

L'équipe a utilisé le programme d'alignement multiple MUSCLE. La construction est basée sur la méthode de maximum de vraisemblance entre les séquences. Les séquences encadrées en bleu correspondent aux séquences fonctionnelles tirées de la recherche bibliographique effectuée

Annexe V : Protocole de test des amorces

	Mode opératoire	Réf : FB-MO-BM-08 Version 2
	Mise au point des amorces pour qPCR	date : 01/02/2017 page 1/2

1. Objet et domaine d'application

Mise au point des couples d'amorces pour la quantification d'expression de gènes.

2. Documents de référence

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

4. Hygiène et sécurité

5. Principe de la méthode

Réaliser des courbes étalons à partir d'une série de dilutions d'un mélange d'ADNc, en faisant varier les conditions d'amplification (température d'hybridation, [amorces], [MgCl₂]) afin d'obtenir une efficacité optimale, comprise entre 85 et 100%, pour le couple d'amorces testé. L'efficacité est calculée grâce à la valeur de la pente de la droite construite par les valeurs de Ct des différents points de la gamme (efficacité = $10^{(-1/pente)} - 1$).

6. Matériels nécessaires

- MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ou CFX96 (Bio-Rad)
- ICycler IQ Optical System Software 3.1 ou CFX Manager (Bio-Rad)
- Barrettes ou plaques (ABgene) ; capuchons plats (ABgene) ou films plastiques (Bio-Rad)
- Cônes à filtre

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

- Eau ultrapure filtrée (UPS) : Eurobio qualité biologie moléculaire
- Amorces : solutions mères à 100 µM : diluer X nmoles lyophilisées dans 10X µl d'eau UPS
solutions à 10 µM : diluer au dixième les solutions mères dans de l'eau UPS (qsp 100µl)
conserver à -20°C
- Kit PCR Quantitative : qPCR Master Mix Plus for SYBR® Green I assays with fluorescein ou MESA Blue 2x PCR Master Mix Plus for SYBR® Green I assays with fluorescein (*Eurogentec*) comprenant l'UNG, une Taq Hot Start, les dNTPs, de la fluoresceine, du MgCl₂ et le SYBR green (conservation à long terme à -20°C, à 4°C 1 mois maximum après décongélation)
- Pool d'ADNc pur : (congélateur -20°C, aliquoté)

8. Contraintes de la méthode

- Port de gants conseillé afin de limiter les contaminations et les traces de doigts sur les capuchons.
- Soyez très précis dans vos pipetages !
- La mise au point peut demander plusieurs essais, il est donc préférable d'aliquoter de faibles volumes de dilutions d'amorces

9. Contenu du mode opératoire.


Détermination de la température optimale d'hybridation des amorces

NB : Il est préférable de faire une PCR gradient afin de déterminer la température d'hybridation optimale des amorces. Pour cela réaliser une PCR gradient sur le ICycler (test de 8 températures possible)

PCR gradient

- 1) Préparer le mix suivant pour n+1 échantillons (9 si barrette de 8 puits) :

qsp 19 µl :	12,8 µl d'eau ultrapure
	4 µl de buffer Taq (5X)
	1,2 µl de MgCl ₂ 25 mM
	0,5 µl de dNTP
	0,25 µl de l'amorce directe
	0,25 µl de l'amorce reverse
	0,05 µl de Taq

	Mode opératoire	Réf : FB-MO-BM-08
	Mise au point des amorces pour qPCR	Version 2 date : 01/02/2017 page 2/2

- 2) Déposer 1 µl d'ADNc (ou ADN) dans chaque puit de la barrette (ou plaque ou tube PCR) et répartir le mix PCR à raison de 19 µl/puit.
- 3) Placer la barrette dans l'appareil ICycler (IA_112_ANA_THER_012). Choisir Register User (FB), protocoles library (gradient), view protocole pour voir le gradient en cours, edit pour modifier (step 2 : T°C basse-T°C haute, exemple 50-60°C). Le gradient s'effectue du puit A (T°C haute) vers le puit H (T°C basse).
- 4) Lancer la PCR avec le programme type suivant :

5 mn à 95°C (dénaturation totale)	
n cycles de	45 sec à 95°C (dénaturation),
	45 sec à X°C (hybridation des amorces),
	1 mn 15 sec à 72°C (élongation)
15 mn à 72°C (élongation finale)	
∞ à 15°C	
- 5) Vérifier le résultat de la PCR par séparation sur gel d'agarose 2%.

Détermination de la concentration optimale en amorce, à la température d'hybridation sélectionnée

NB : Dans une optique d'économie tester dans un premier temps 1 concentration d'amorces (200 nM) en duplicat sur des dilutions en série d'un mélange d'ADNc.

- 1) Réaliser des dilutions en série au quart d'un pool d'ADNc comprenant les points suivants : 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024, 1/4096 (prévoir au moins 40 µl de chaque dilution par plaque qPCR).
- 2) Préparer les mix correspondant à chaque concentration de chaque couple d'amorces pour n+2 puits. (5 dilutions x 2 puits (duplicat) ou x 3 puits (triplicat) + 2 ou 3 NTC = 12 ou 18 puits, soit des mix pour 14 ou 20 puits). Vf = 12 µl / puit

		Concentrations amorces							
		100 nM		200 nM		300 nM		400 nM	
		duplicat	triplicat	duplicat	triplicat	duplicat	triplicat	duplicat	triplicat
nb puits		14 puits	20 puits	14 puits	20 puits	14 puits	20 puits	14 puits	20 puits
Mix qPCR	Master mix (µl)	52,5	75	52,5	75	52,5	75	52,5	75
	amorce di (µl)	2,1	3	4,2	6	6,3	9	8,4	12
	amorce re (µl)	2,1	3	4,2	6	6,3	9	8,4	12
	eau UPS (µl)	111,3	159	107,1	153	102,9	147	98,7	141

- 3) Déposer 3 µl de chacune des dilutions d'ADNc dans les puits correspondants (en ligne de plaque qPCR par dilution) et 3 µL d'eau pour le témoin négatif.
- 4) Lancer la PCR en programmant correctement le logiciel :
 - Programme avec courbe de fusion (ex : Mesa Blue fusion)
 - choisir un plan de plaque « efficacité d'amorce » pour l'appareil MyIQ (pas nécessaire sur CFX)

Exploitation des résultats

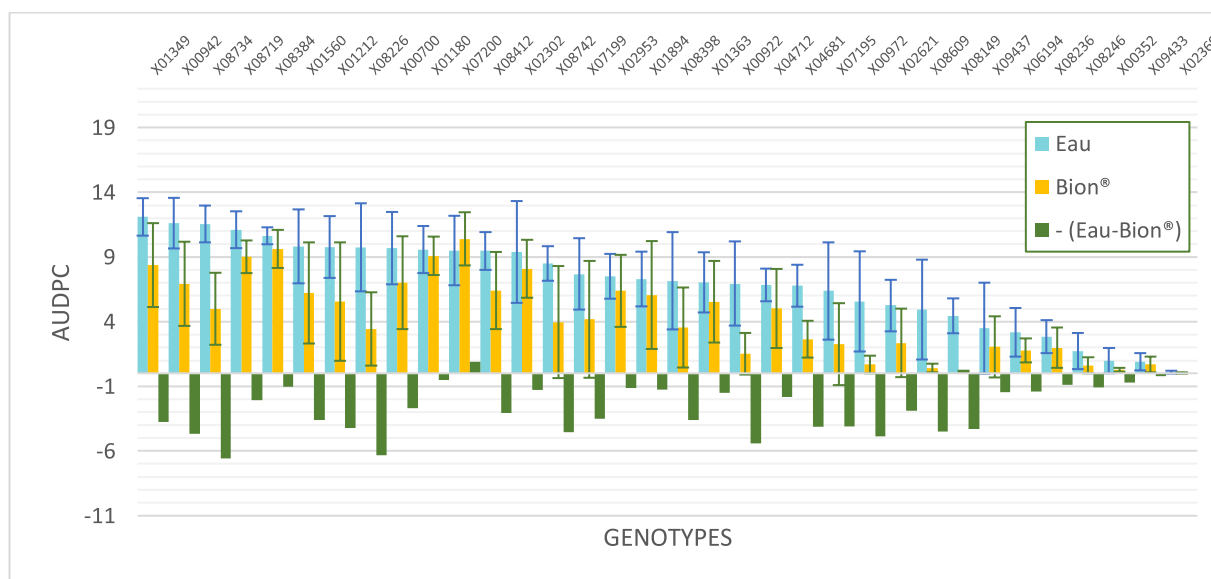
- Vérifier la qualité des répliqués et des dilutions en affichant les courbes d'amplification. Pour les dilutions, une différence de 2 Ct est attendue entre chaque dilution.
- Pour chaque couple d'amorces, sélectionner les puits correspondant aux différentes dilutions d'ADNc et vérifier l'efficacité, la valeur de la pente et le coefficient de corrélation du modèle linéaire créé par le logiciel (plus il est proche de 1, meilleure est la corrélation ; en pratique on considère que le modèle est bon à partir de 0,980). L'efficacité doit être comprise entre 85 et 100%. Il est souvent nécessaire d'éliminer les points correspondant à la dilution 1/16 en raison de la présence d'inhibiteurs de PCR (efficacité >100%).
- Dans *Melt Curve*, il est nécessaire de vérifier l'absence de dimères et la présence d'un seul amplicon.

Rédacteurs : M. Gaucher, T. Dugé, M.N. Brisset

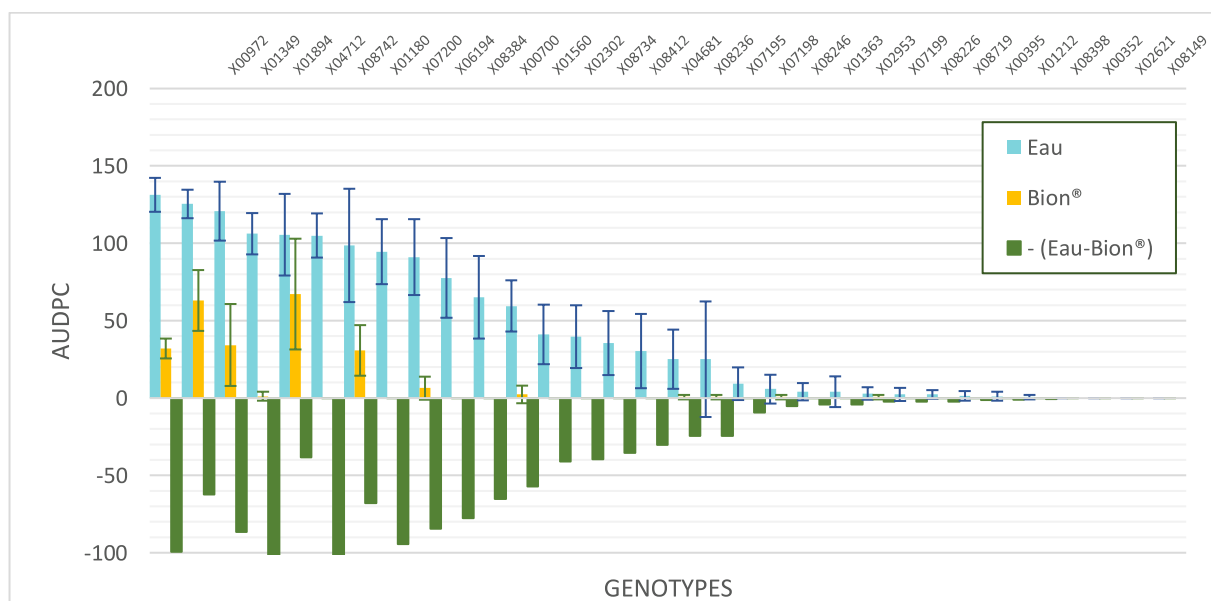
Annexe VI : tableau récapitulatif complet des gènes étudiés

Mécanisme de défenses	Voie de défenses	Nom du gène	Séquence ciblée	Amorces utilisées	Concentration (nM)	
Barrière chimique	PR protéines	Classe III chitinase (PR-8)	MD07GI282800	di : CCCTTAGGGGACGCTGTTT re : GCTCTGCTACATACACACTTCTT	300	
		PR-10	MD16GI160700	di : GCAAACTACTACATAGCCCTACACT re : GTGGTAGTGGGTGATACTTGTGATG	200	
	Assimilée à une PR protéine	Agglutinine (Agg)	MD07GI171100	di : CGCAACATGCAGAACAGGAG re : ACGGTGAGATGGAGAGTAATA	200	
		Voie des phénylpropanoïdes	Polyphenol oxidase (PPO)	MD10GI299400	di : CGCAGAGTTAGTCCGAGTCAAG re : CTC C C A G C T T C T C G T A C T T T	200
	Métabolisme secondaire		Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase (HMGR)	AY043490	di : AACAGGTCAAGCAGATT C re : TTGTCAGAGCAGTAGTTG	400
		Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS)	AY083165	di : TCTTGGTTGGTGGTGAAG re : CTGCCCTTTGTAATCTTGC	200	
	Stress oxydant	Voie de la cystéine	Cystéine lyase (CSL)	AY347795	di : CACCCTGTCTGTTTCCAAATCG re : AGCAATCTTATCTTCTCCCTCTC	200
			Ascorbate peroxidase (APOX)	MD00GI029300	di : GCCAATGGCAGGTCTTTGTGAATG re : GAGACATCAACCCCTCCACTTGTG	200
	Barrière physique	Modification pariétale	Cinnamyl alcool dehydrogenase (CAD)	AF053084	di : GGAGCCCAAGACAGACTTCAAC re : CGCCTTCAACCCCTCAACAG	200
			Callose synthase (CalS)	CN496203	di : TGCCTTCATGCCAACGGGATG re : CGGAAACAAACGGAAACCAAGCC	200
		Extensine	MD05GI338000 - MD10GI293100	di : ACCGGTTCACCCCTCTATGTA re : GTCGAGCCGGAGTAGTTG	200	

Annexe VII : Graphiques des tests de résistances à la tavelure (2017) et au feu bactérien (2018) et corrélation avec l'expression constitutive des gènes d'intérêt



Graphique de l'AUDPC du ratio longueur de nécrose sur longueur total du test feu bactérien (2018) avec l'application de la modalité eau (bleu), avec l'application du Bion® à 0,2g/L (jaune) et la différence Eau-Bion® (vert)

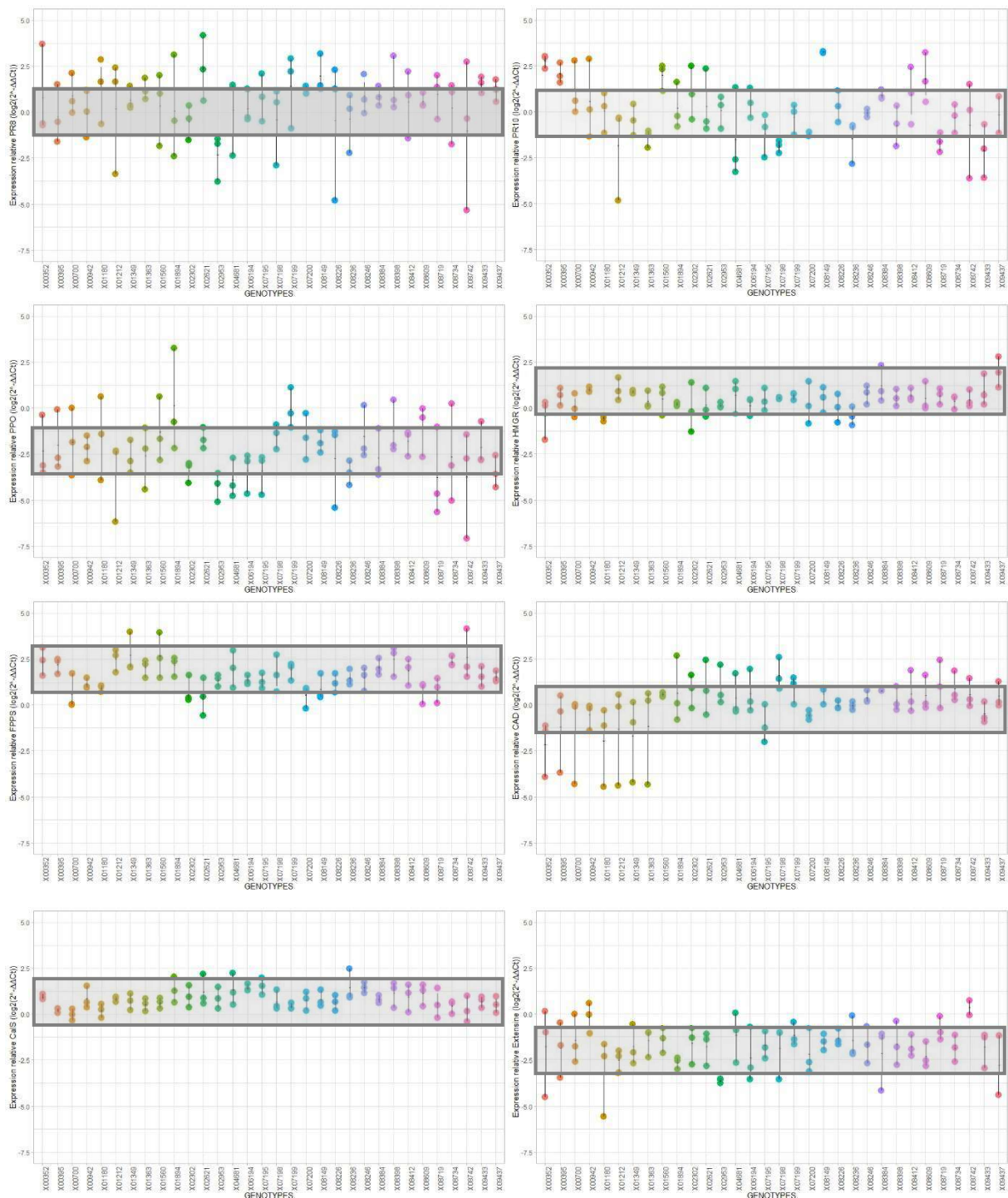


Graphique de l'AUDPC de la sporulation du test tavelure (2017) avec l'application de la modalité eau (bleu), l'application de la modalité Bion® 0,4g/L (jaune) et la différence Eau-Bion® (vert)

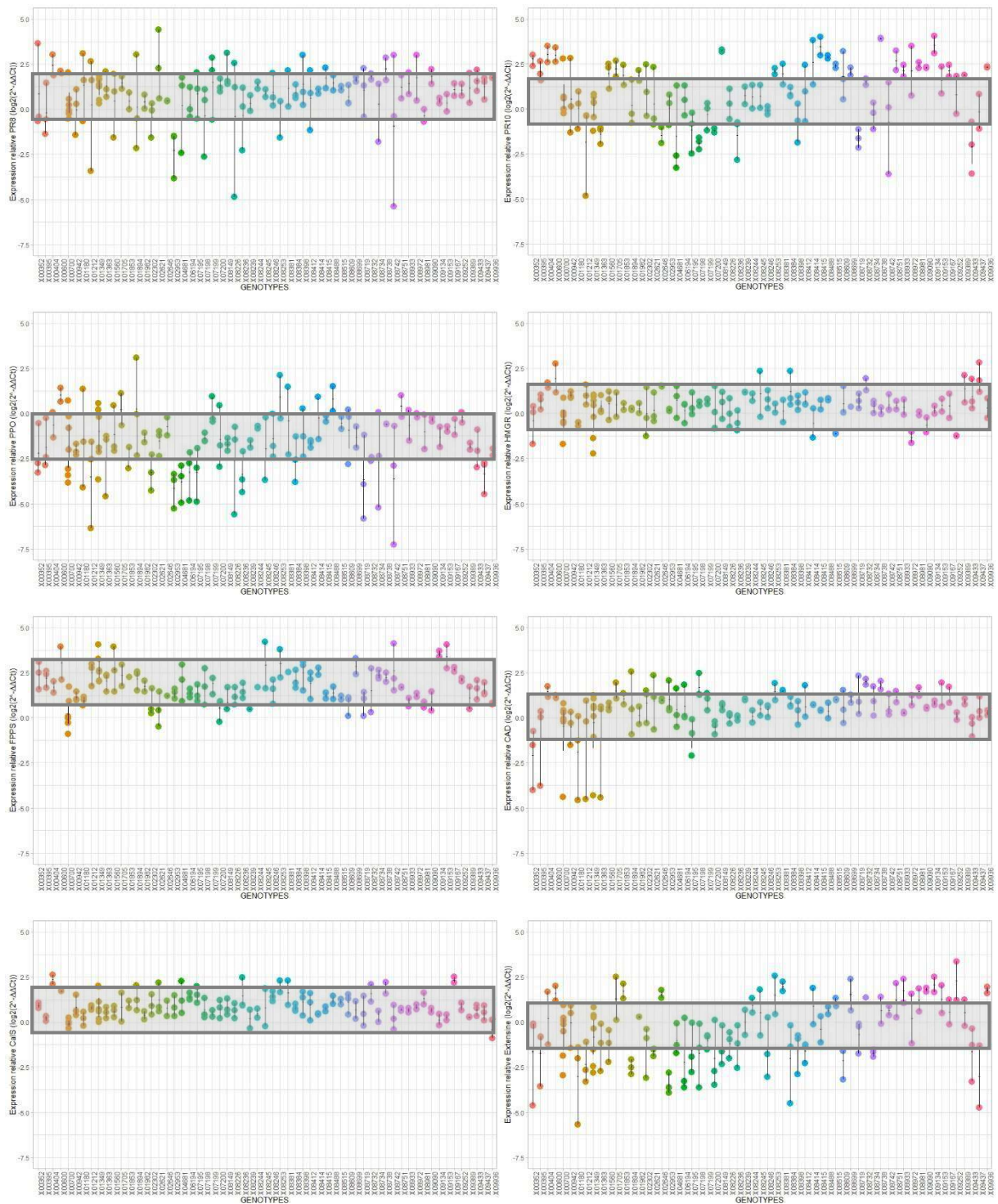
		PR8	PR10	Agg	PPO	HMGR	FPPS	CSL	APOX	CAD	CaS	Extensine
Corrélation feu bactérien (2018)	Eau-Bion	-0,13	-0,09	0,35	-0,11	0,30	0,40	-0,12	-0,25	0,19	-0,20	0,47
	Efficacité	-0,03	0,10	0,37	-0,11	0,07	0,42	0,05	0,00	-0,02	0,26	0,43
Corrélation tavelure (2017)	Eau-Bion	-0,12	0,11	-0,29	-0,03	0,31	0,18	0,24	0,27	0,04	0,05	-0,10
	Efficacité	-0,25	-0,09	0,14	-0,40	0,46	0,33	0,07	0,30	0,47	0,43	0,24

Tableau des corrélations entre les expressions relatives au niveau constitutif des gènes d'intérêt par rapport à la différence entre la modalité eau et la modalité Bion® et l'efficacité du Bion® lors du test feu bactérien de 2018 et lors du test tavelure de 2017

Annexe VIII : Graphiques de variabilité des autres gènes d'intérêt sur la population A



Annexe IX : Graphiques de variabilité des autres gènes d'intérêt sur la population B



	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Science et ingénierie du végétal / Semences et plants : recherche et développement, production, commercialisation Enseignant référent : Valérie Le Clerc
Auteur(s) : Camille Pubert Date de naissance* : 21/10/1994	Organisme d'accueil : INRA-IRHS Adresse : 42 Rue Georges Morel, 49070 Beaucouzé
Nb pages : 54 Annexe(s) : 9	Maître de stage : Laure Perchepied
Année de soutenance : 2019	
Titre français : Etude du niveau constitutif des défenses basales du pommier en tant que facteur prédictif de résistance (tavelure et feu bactérien) et d'efficacité des stimulateurs de défenses des plantes Titre anglais : Study of the constitutive level of basal apple defenses as a predictor of resistance (scab and fire blight) and efficacy of plant defense stimulators	
Résumé (1600 caractères maximum) : La pomme est l'un des fruits le plus consommé et produit au monde et en France c'est la première production de fruits frais du pays. Depuis quelques années la consommation de pomme est en légère hausse mais sa culture fait débat. En effet, pour protéger les vergers et répondre aux critères de commercialisation, la pomme est le fruit le plus traité. Dans le contexte actuel, la réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques est un enjeu majeur. C'est dans ce cadre, que l'équipe ResPom, de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) a développé le projet PREDIRE (PREDIction of REsistance in apple) en 2016. L'hypothèse de départ est que le niveau constitutif des défenses basales est à l'origine de la capacité de défense de la plante pour résister et contrôler les attaques des bioagresseurs et de l'efficacité de stimulateur de défense des plantes (SDP). L'étude présentée dans ce mémoire correspond à plusieurs phases de travail réalisées pour explorer cette hypothèse. Pour commencer, l'expression constitutive d'un panel de 11 gènes de défense a été évaluée sur une population de 32 génotypes sélectionnés pour leur diversité de résistance à la tavelure et au feu bactérien. Cette population a également servi à l'évaluation de l'efficacité du Bion® face à ces mêmes bioagresseurs. Ensuite pour renforcer les analyses, l'expression constitutive du panel a été évaluée sur une extension de 29 génotypes. Nous avons ainsi pu analyser la corrélation entre l'expression constitutive des gènes de défenses et la résistance aux bioagresseurs et l'efficacité du Bion®.	
Abstract (1600 caractères maximum) : The apple is one of the most consumed and produced fruit in the world and in France it is the first production of fresh fruit of the country. In recent years apple consumption has risen slightly but its culture is debated. Indeed, to protect the orchards and respect the marketing criteria, the apple is the most processed fruit. In the current context, reducing the use of plant protection products is a major issue. It is within this framework that the ResPom team of the Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) proposed the PREDIRE project (PREDIction of REsistance in apple) in 2016. The starting hypothesis is that the level basal defenses are responsible for the plant's ability to resist and control pest attacks and plant defender stimulator (PPS) efficiency. The study presented in this dissertation corresponds to several phases of work carried out to explore this hypothesis. To begin, the constitutive expression of a panel of 11 defense genes was evaluated on a population of 32 genotypes selected for their diversity of resistance to scab and fire blight. This population was also used to evaluate the effectiveness of Bion® against these same pests. Then to strengthen the analyses, the constitutive expression of the panel was evaluated on an extension of 29 genotypes. We were able to analyze the correlation between the constitutive expression of defense genes and pest resistance and the effectiveness of Bion®.	
Mots-clés : pomme, gène de défenses, diversité des séquences, expression constitutive, RT-qPCR, tavelure, feu bactérien, SDP	
Key Words: apple, defensive gene, sequence diversity, constitutive expression, RT-qPCR, scab, fire blight, PPSm	

* Elément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires