

## Mémoire de Fin d'Etudes

**Master 2 Mention Biologie Végétale (BV)**  
**Parcours : Gestion de la Santé des Plantes**

Année universitaire 2022-2023

Evaluation de l'efficacité d'une nouvelle stratégie de bio-contrôle  
appliquée à la tavelure du pommier

Par : Pierre Normand



Soutenu à Angers le : 08/09/23

Maître de stage : Caffier Valérie

## **ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné, Normand Pierre

déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.



Signature :

## REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à Valérie Caffier qui m'a accueilli et supervisé en tant que stagiaire au sein de l'équipe EcoFun dans le cadre de mon mémoire de fin d'étude. Sa disponibilité pour répondre à mes questions, échanger sur mes idées, me guider dans mes réflexions ainsi que ses conseils avisés ont été d'une grande aide à chaque étape de mon mémoire. J'ai pu avoir une vision concrète de la recherche, des défis rencontrés et solutions trouvées.

J'aimerais aussi remercier Mélanie Sannier et Maïwenn Gadras, qui m'ont également, encadré, conseillé, et soutenu dans mon travail. Leurs conseils éclairés, leurs suggestions, leur passion pour la recherche et leur patience m'ont grandement aidé durant mon stage. Je suis reconnaissant d'avoir eu la chance de travailler à leurs côtés. J'ai acquis des connaissances techniques en biologie moléculaire, qui m'aideront forcément dans ma carrière professionnelle.

Je tiens aussi à remercier l'équipe Respom de l'IRHS de Beaucouzé, pour avoir partagé un jeu de données qui m'a beaucoup aidé pour interpréter mes résultats. Merci Anthony, de m'avoir expliqué comment analyser et interpréter des résultats d'une qPFD. Merci Marie-Noëlle Brisset, de m'avoir conseillé, et d'avoir corrigé mes résultats de qPFD.

Merci à Anne Duval-Chaboussou, Yohana LALOUM, Jean Le Maguet, membres des centres techniques nationaux de la pomme (CITFL et IFPC), avec qui j'ai étroitement travaillé sur le projet ENFIN. Merci de m'avoir suivi, écouté, et conseillé.

Merci à Frédérique Didelot, pour m'avoir expliqué clairement le fonctionnement du logiciel RIMPro.

Merci à Christian Cattaneo et toute l'équipe Phénotic.

Enfin, merci à toute l'équipe EcoFun, Bruno Le Cam, Maël Baudin, Christophe Lemaire, pour le bon environnement de travail, le soutien et la bonne humeur au sein du laboratoire.

Je suis également reconnaissant d'avoir eu l'opportunité de contribuer, à ma modeste échelle, au projet ENFIN avec ce mémoire.

Cordialement,

Pierre Normand

# Table des matières

INTRODUCTION .....	11
I – Présentation de l’entreprise .....	11
II - Etat de la bibliographie .....	13
A - <i>Venturia inaequalis</i> agent de la tavelure sur pommier .....	13
B - Cycle biologique et pathogénie de <i>Venturia inaequalis</i> .....	13
1 - Cycle biologique .....	13
2 - Facteurs de pathogénie .....	17
C – Symptômes et méthodes de lutte .....	17
1 - Symptômes .....	17
2 - Méthodes de lutte .....	19
D - Recherche de nouvelles méthodes de lutte .....	25
1 - Résultats initiaux EcoFun .....	25
2 - Le projet ENFIN ! .....	27
E - Objectif du stage .....	29
1 - Mes tâches .....	29
MATERIELS ET METHODES .....	31
I – Invention 1 : Détournement sexuel .....	31
A – Travaux réalisés au verger préalablement à mon stage .....	31
1 - Description des vergers .....	31
2 – Traitement de la litière foliaire à l’automne 2022 .....	31
3 – Maturation des ascospores et logiciel RIMpro .....	31
B – Travaux réalisés pendant mon stage .....	33
1 – Analyse moléculaire des litières foliaires .....	33
2 – Test d’efficacité de l’invention 1 .....	35
II – Invention 2 : Effet protecteur des souches PYR .....	39
A – Capacité à induire les défenses du pommier .....	39
B – Test d’efficacité de l’invention 2 .....	45
.....	46
RESULTATS .....	49
I – Invention 1 : Détournement sexuel .....	49
A – Analyse des litières foliaires .....	49
B – Test d’efficacité (invention 1) .....	49
1 - Inocula des sites Beaucozéz, Lanxade, La Morinière .....	49
2 - Inocula du site de Sées .....	51
II - Invention 2 : Effet protecteur des souches PYR .....	51

A – Capacité à induire les défenses du pommier .....	51
.....	52
.....	52
.....	52
.....	52
B – Test d’efficacité (invention 2) .....	55
.....	56
.....	56
DISCUSSION .....	57
I – Invention 1 : Détournement sexuel .....	57
A – Analyse des litières foliaires par PCR .....	57
B – Test d’efficacité (invention 1) .....	57
II – Invention 2 : Effet protecteur des souches PYR.....	61
A – Capacité à induire les défenses du pommier .....	61
B – Test d’efficacité (invention 2) .....	65
CONCLUSION .....	67
BIBLIOGRAPHIE.....	69

## **LISTE ABREVIATION**

ACP : Analyse en composantes Principales

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique

AGG : Agglutinine

APOX : Ascorbate peroxidase

ARN : Acide RiboNucléique

ANOVA : Analyse de la variance

ASM : Acibenzolar-S-Methyl

AUDPC : Area Under the Disease Progres Curve (aire sous la courbe de progression de la maladie)

BIS2 : Biphenyl synthase

CAD : Cinnamyl alcool dehydrogenase

CalS : Callose synthase

CHS : Chalcone synthase

CSL : Cystéine lyase

Ct : Cycle de seuil de qPCR

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

DFR : Dihydroflavonol reductase

DPI : Days Post Inoculation (nombre de jours après inoculation)

EIN3 : Ethylene insensitive 3

EDS1 : Enhanced disease susceptibility 1

FDS : Farnesyl diphosphate synthase

FPPS : Farnesyl pyrophosphate synthase

GADPH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GST : Glutathionne S transferase

HGMR : Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

IRHS : Institut de Recherche en Horticulture et Semences

JAR : Jasmonic Acid

Lox2 : Lipoxygenase 2

PAL : Phenylalanine Ammonia-lyase

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

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

Pect : Pectinesterase

POMI : *Venturia inaequalis f.sp pommi*

POX : Peroxidase

PPO : Polyphenol oxidase

PR : Resistance Protein

PR-1 : Pathogenesis related protein 1

PR-2 : Pathogenesis related protein 2

PR-4 : Pathogenesis related protein 4

PR-5 : Pathogenesis related protein 5

PR-8 : Pathogenesis related protein 8

PR-10 : Pathogenesis related protein 10

PR-14 : Pathogenesis related protein 14

PYR : *Venturia inaequalis f.sp pyracantha*

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

qPFD : Puce à Faible Densité Quantitative

Far : (E,E) - alpha - farnesene synthase

RT : Reverse transcriptase (transcription inversée)

SAM : Sélection assistée par marqueurs

SDP : Stimulateur de défenses des plantes

Tua : Tubuline alpha chaîne

Vi : *Venturia inaequalis*

WRKY : WRKY transcription factor 30

## LISTE ANNEXE

Annexe I : Protocole d'extraction d'ARN (kit NucleoSpin RNA Plant)Normand Pierre – M2 GSP- Evaluation de l'efficacité d'une nouvelle stratégie de bio-contrôle appliquée à la tavelure du pommier 31 .....	69
Annexe II : Protocole d'extraction d'ARN (kit NucleoSpin RNA Plant)Normand Pierre – M2 GSP- Evaluation de l'efficacité d'une nouvelle stratégie de bio-contrôle appliquée à la tavelure du pommier 31 .....	71
Annexe III : Protocole de Transcription inverse et PCR de vérification.....	74
 Annexe IV : Cinétiques de surface foliaire tavelée sur variété Gala suite à une inoculation d'ascospores POMI en vrac, précédé de deux traitements Bion, EAU ou PYR ( <i>Venturia inaequalis</i> f.sp <i>pyracanthae</i> ).....	77
 Annexe V : Cinétiques de surface foliaire tavelée sur variété Golden Delicious suite à une inoculation d'ascospores POMI en vrac, précédé de deux traitements Bion, EAU ou PYR ( <i>Venturia inaequalis</i> f.sp <i>pyracantha</i> ).....	77



## LISTE ILLUSTRATION

Figure 1 : Présentation des axes de recherches et des équipes de l'IRHS .....	12
Figure 2 : Cycle biologique de <i>Venturia inaequalis</i> sur pommier (Agrios, Plant Pathology, p. 506, Copyright Elsevier, 2004) .....	16
Figure 3 : Proportion d'ascospores de <i>Venturia inaequalis</i> résultant en une infection en fonction du temps d'humectation et de la température pendant l'infection (Philion et al., 2020) .....	18
Figure 4 : Symptômes de tavelure sur feuille de variété Golden Delicious (Beaucouzé 17/05/23, Pierre Normand) .....	20
Figure 5 : Dispositif des litières foliaires de pommier sous grilles et palox utilisé pour l'incubation hivernale (La Morinière, automne 2022, Anne Duval-Chaboussou) .....	32
Figure 6 : Sortie RIMpro lors de l'envoi du lot 2 du site de Lanxade (zones bleu foncé : longueur de la pluie, zone bleu clair : longueur de la période d'humectation ; source : rimpro.eu).....	34
Figure 7 : Dispositif de bâches et de cloisons en salle climatisée pour les tests d'efficacité (Beaucouzé 17/05/23, Pierre Normand).....	36
Figure 8 : Schéma représentatif des feuilles de pommier sur lesquelles sont notés les symptômes de tavelure.....	38
Figure 9 : Exemples de feuilles de pommier présentant différents pourcentages de surface tavelée entre 0 à 100 % (Beaucouzé 17/05/23, Pierre Normand) .....	38
Figure 10 : Dispositif des semis issus de pépins de pommier de Golden Delicious en mini-serre (Beaucouzé 04/04/23, Pierre Normand).....	42
Figure 11 : Compteur de particules (coulter counter) utilisé pour estimer la concentration en spores (Beaucouzé 03/03/23, Pierre Normand).....	42
Figure 12 : Exemple de plan de plaque 96 puits utilisé en qPFD .....	46
Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des ADN extraits des litières foliaires de pommier inoculées à l'automne 2022 avec les modalités EAU ou PYR ( <i>Venturia inaequalis</i> f.sp <i>pyracantha</i> ), amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Sites : LANX = Lanxade (Golden), BCZ = Beaucouzé (Gala), MOR = La Morinière (Golden), JUD = Sées (Judeline), PJ = Sées (Petit Jaune) ; T(+) 1 : ADN de <i>pyracantha</i> inoculé par PYR ; T(+) 2 : Souche monoconidienne de collection 1381 ; T(-) = H2O. ....	50
Figure 14 : Cinétiques du pourcentage de surface foliaire tavelée sur 3 variétés de pommiers inoculées avec des suspensions d'ascospores de <i>Venturia inaequalis</i> issues des litières foliaires inoculées par les modalités EAU et PYR à l'automne 2022 pour différents sites. A = GALA ; B = GOLDEN	

DELICIOUS ; C = JUDELINE. Ns indique qu'aucune différence significative est observée entre les modalités EAU et PYR sur un site. Les lettres a et b indiquent une différence significative entre les modalités EAU et PYR sur un site.....	52
Figure 15 : Expression relative des 29 gènes de défense (cumulés) des différents échantillons 3 jours après inoculation de PYR ( <i>Venturia inaequalis</i> f.sp <i>pyracanthae</i> ) et du Bion comparé au témoin eau. A= 1ère expérimentation ; B = 2ème expérimentation ; 400 = 400 000sp/ml ; 1,5 = 1,5 millions sp/ml .....	54
Figure 16 : Expression relative des gènes de défense induits par la souche PYR ( <i>Venturia inaequalis</i> f.sp <i>pyracanthae</i> (1,5 millions spores/ml) et par le Bion comparé au témoin eau (2 <sup>ème</sup> expérience) .....	54
Figure 17 : Contribution des variables sur les composantes principalesNormand Pierre – M2 GSP-Evaluation de l'efficacité d'une nouvelle stratégie de bio-contrôle appliquée à la tavelure du pommier 23 .....	55
Figure 18 : Plot représentant le pourcentage des variances expliquées en fonction des dimensionsFigure 19 : Contribution des variables sur les composantes principales .....	56
Figure 20 : Coordonnées de chaque échantillon sur les deux composantes principales de l'ACPFigure 21 : Plot représentant le pourcentage des variances expliquées en fonction des dimensions .....	56
Figure 22 : Coordonnées de chaque échantillon sur les deux composantes principales de l'ACP. Données fournies par Respom sur xx produits criblés pour leur effet de stimulation des défense (en bleu) et 3 stimulateurs de référence (Bion Respom, Limocide Respom et Soriale Respom). Données obtenues au cours de ce stage indiquées ENFIN pour les modalités PYR (à 1,5 millions sp/ml et 400 000 sp/ml), Bion et Eau (moyenne des coordonnées des 2 expériences.....	56
Figure 23 : Cinétiques du pourcentage de surface foliaire tavelée sur 3 variétés de pommiers inoculées avec des suspensions de <i>Venturia inaequalis</i> en vrac (conidie), précédé de deux traitements EAU, PYR ou Bion.. A = GALA ; B = GOLDEN DELICIOUS ; C = JUDELINEC .....	58

# INTRODUCTION

## I – Présentation de l'entreprise

L'INRAE, institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement est le premier institut national de recherche agronomique au monde spécialisé dans les domaines scientifiques de l'agriculture l'alimentation et l'environnement. Anciennement INRA, cet institut a fusionné avec l'IRSTEA (spécialisé en agriculture et environnement) en janvier 2020 pour former l'INRAE. Aujourd'hui, on peut compter une communauté de 12 000 personnes, avec 18 centres de recherches comprenant un peu plus de 200 unités de recherche et une quarantaine d'unités expérimentales. L'institut est aussi partenaire de 33 sites universitaires et possède un réseau international lui permettant de collaborer avec des équipes de recherches à travers le monde. En Pays de la Loire, le centre INRAE est le 2<sup>e</sup> organisme de recherche publique. En partenariat avec l'Université d'Angers ainsi que l'institut-Agro Rennes-Angers et l'ESA (Ecole Supérieure des Agricultures), il comprend une communauté de plus de 1000 personnes. Ses 13 unités de recherche s'appuient sur 4 unités d'appui, 2 structures fédératives de recherche, des plateformes et plateaux techniques, des centres de ressources biologiques et une unité expérimentale constituée de 70 hectares de vergers. Il entretient également des liens étroits avec le GEVES (Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences).

Parmi les unités de recherches, on retrouve l'IRHS (institut de Recherche en Horticulture et Semences) qui est une unité mixte de recherche INRAE, Institut-Agro Rennes-Angers, et l'Université d'Angers. L'IRHS est constituée de 260 personnes, rassemblant des expertises de généticiens/génomiciens, phytopathologistes, physiologistes/éco physiologistes, biochimistes, modélisateurs, bioinformaticiens, et biophysiciens s'intéressant à la qualité et la santé des espèces horticoles et la production de semences. L'IRHS est organisé en 4 axes de recherches (Figure 1), et comprend 14 équipes de recherche constituées autour de leur projet scientifique.

Mon stage de fin d'étude prend place au sein de l'équipe Ecofun (Ecologie évolutive chez les champignons), qui s'inscrit dans l'axe de recherche 2 de l'IRHS « Mécanismes et stratégies de bio-contrôle et autres méthodes alternatives aux produits chimiques ». Cette équipe comprend 6 salariés permanents (enseignants-chercheurs, chercheurs, et technicien de laboratoire) et 1 personne en CDD (ingénieur). Les travaux de cette équipe portent sur la santé des plantes et plus particulièrement sur les agents pathogènes des arbres fruitiers.

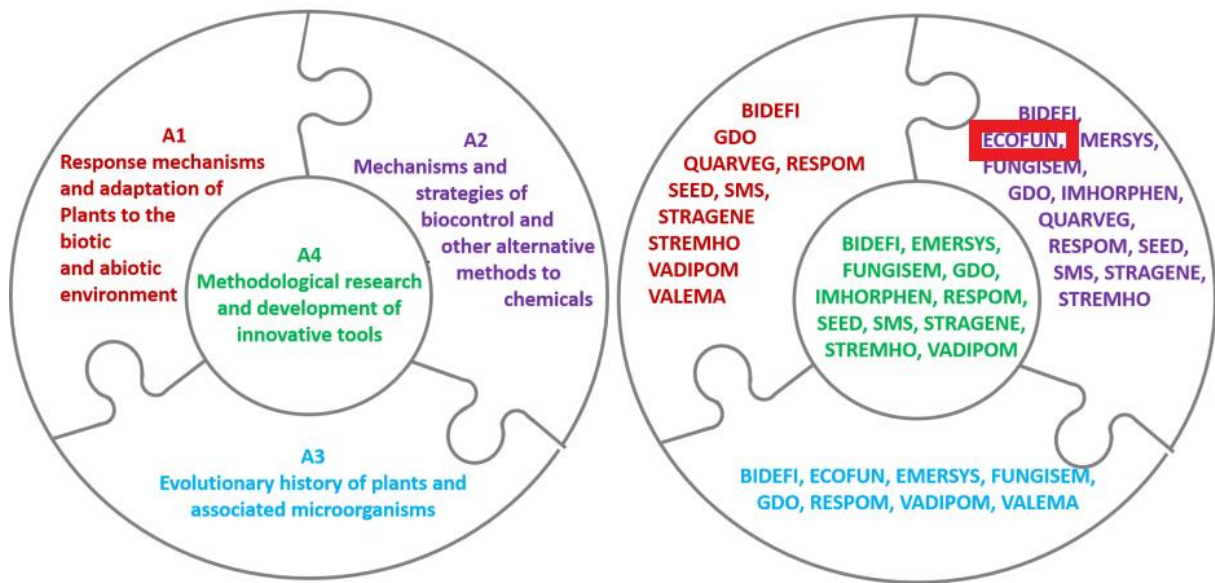


Figure 1 : Présentation des axes de recherches et des équipes de l'IRHS

Leurs recherches sont principalement centrées sur *Venturia inaequalis*, l'agent pathogène de la tavelure du pommier. L'adaptation de ce champignon aux facteurs de résistances du pommier est étudiée, ainsi que l'étude génomique de son pouvoir pathogène. Enfin, des recherches sont aussi menées sur des méthodes de lutte durable contre la tavelure. C'est sur ce dernier point que mon stage prend place : l'évaluation de l'efficacité d'une nouvelle technique de bio-contrôle appliquée à la tavelure du pommier.

## II - Etat de la bibliographie

### A - *Venturia inaequalis* agent de la tavelure sur pommier

*Venturia inaequalis* est un champignon phytopathogène hémibiotrophe appartenant au genre *Venturia* du phylum Ascomycète de la classe des dothideomycètes (MacHardy et al., 2001). Il est responsable de la tavelure du pommier, la plus importante maladie sur pommier dans le monde. Cette maladie a un impact économique négatif dû aux pertes de rendement, et aux utilisations de fongicides (Bowen et al., 2011). Ce champignon est hétérothallique (Keitt 1952 ; Jha et al., 2009); c'est à dire qu'il nécessite des souches de signes sexuels opposés pour la reproduction sexuée, et les gamètes mâle et femelle sont formés sur des thalles différents. *Vi* (*Venturia inaequalis*) est originaire d'Asie centrale, le centre d'origine du pommier sauvage *Malus x sieversii* (Ledeb) M. Roem, le principal géniteur du pommier cultivé (*Malus x domestica* Borkh) (Gladieux et al., 2010). *Vi* s'est répandu autour du globe grâce à la domestication et le commerce de son hôte, le pommier cultivé (*Malus x domestica*), l'une des cultures fruitières les plus importantes (Gladieux 2010).

En 2023, la production Française de pommes est estimée à 1 581 000 tonnes, dépassant de 8% la moyenne des récoltes 2018-2022 (Agreste). La surface agricole de cette culture est de 40 901 ha (Agreste), et l'Hexagone se place en troisième meilleur producteur Européen de pomme derrière la Pologne et l'Italie (FranceAgrimer).

### B - Cycle biologique et pathogénie de *Venturia inaequalis*

#### 1 - Cycle biologique

Le cycle de *Vi* comprend deux phases. La première est une phase saprophytique dans les feuilles mortes au sol, au cours de laquelle s'effectue la reproduction sexuée de l'automne



au printemps. La seconde est une phase parasitaire sur les feuilles et les fruits du printemps à l'automne, au cours de laquelle s'effectue la reproduction asexuée (Figure 2). La phase saprophytique débute par le développement des hyphes du stroma sous la cuticule des feuilles mortes au sol. Lorsque deux hyphes de deux souches de *Vi* de signes sexuels opposés se rencontrent, un appariement a lieu entre les noyaux mâles de l'anthéridie (gamétange mâle) et les noyaux femelles de l'ascogone (gamétange femelle). La rencontre des deux hyphes entraîne la formation d'un mycélium secondaire étant à l'origine de la structure de reproduction : l'asque. Ensuite, la fusion se produit entre ces noyaux dans l'asque, donnant un zygote. L'asque s'allonge ensuite et le noyau subit une étape de méiose et de mitose donnant huit noyaux haploïdes qui deviendront les ascospores. Le développement des asques et des ascospores se produit dans le pseudothèce, un organe de reproduction formé par les hyphes au milieu du stroma (Jha *et al.*, 2009). *Vi* hiverne donc principalement sous forme de pseudothèces dans la litière foliaire morte au sol (Bowen *et al.*, 2011). La maturation des pseudothèces se fait progressivement selon la température pendant 2 à 4 mois après le débourrement. Lorsque les pseudothèces sont matures, les ascospores (spores issues de reproduction sexuée) sont projetées lors des épisodes pluvieux et dispersées par le vent. Une fois que les ascospores atteignent les feuilles de l'hôte, l'infection primaire de la phase parasitaire prend place (Bowen *et al.*, 2011). Le risque d'infection est plus élevé sur les jeunes feuilles et fruits qui sont plus sensibles (Xu *et Robinson* 2005), tandis que les feuilles qui vieillissent deviennent de plus en plus résistantes (c'est la résistance ontogénique) (Gusberti 2013). De plus, pour que la contamination ait lieu, le feuillage doit être humecté pendant une durée minimum variant selon la température ambiante (avec un optimum entre 15 et 22 °C) (Philion *et al.*, 2020) (Figure 3). Les premières étapes de l'infection sont la germination du tube germinatif issue des ascospores, l'adhésion et la pénétration de la cuticule. L'adhésion et la pénétration sont initiées par un appressorium (structure fongique permettant la pénétration de l'hôte), qui se développe ultérieurement en stroma (structures multicouches pseudo-parenchymateuses) permettant la prise de nutriments dans l'espace sub-cuticulaire (Bowen *et al.*, 2011). Les stromae se différencient ensuite en conidiophores portant à leurs extrémités les conidies (spores issues de reproduction asexuée), qui sont à l'origine des symptômes typiques de la tavelure. Les conidies sont disséminées par le vent et la pluie, et initient l'infection secondaire (MacHardy *et al.*, 2011). Les conidies de *Vi*, de même que pour les ascospores, nécessitent que le feuillage soit humecté pendant une durée minimum variant selon la température ambiante (Philion *et al.*, 2020). À la chute des feuilles en automne, la phase de reproduction sexuée se remet en place et un nouveau cycle peut commencer.

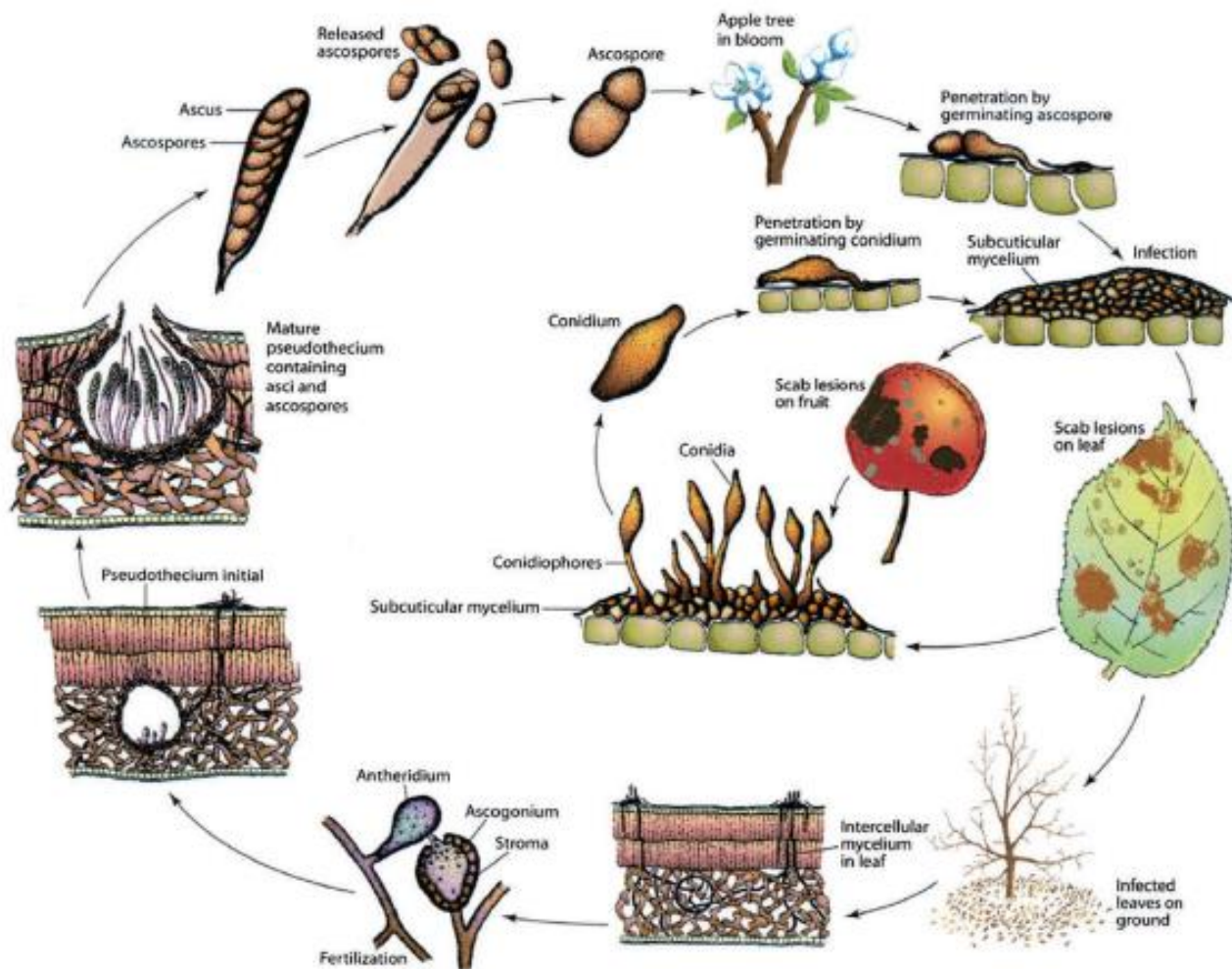


Figure 2 : Cycle biologique de *Venturia inaequalis* sur pommier (Agrios, *Plant Pathology*, p. 506, Copyright Elsevier, 2004)



## 2 - Facteurs de pathogénie

La réussite de l'infection par *Vi* repose sur des procédés cellulaires et moléculaires spécifiques. En effet, l'attachement des conidies/ascospores sur la surface hydrophobe (cutine) des feuilles/fruits du pommier, repose sur l'appressorium qui produit une substance mucilagineuse (Smereka et al., 1987). Pour la pénétration de la cuticule, *Vi* sécrète des enzymes hydrolytiques (Jha et al., 2009). En effet, il a été démontré que des cutinases extracellulaires sont produites par des conidies germées et du mycélium de *Vi* (Köller et al., 1991). De plus, d'autres enzymes dégradant la paroi des cellules (*Cell Wall Degrading Enzymes*) ont été identifiées comme des endo-exo polygalacturonases, estérases,  $\beta$ -D-glucosidase, facilitant la pénétration (Valsangiamomo et al., 1992 ; Kollar 1998). *Vi*, possédant une phase biotrophe, va détourner les nutriments de son hôte sans provoquer de dégâts conséquents (Bowen et al., 2011). Ainsi, comme d'autres champignons phytopathogènes biotrophes, il y aura la création d'un puits à nutriments au niveau du site d'infection, et une modification du taux d'hormones sur ce site (Walters et McRoberts 2006). En effet, il a été mis en évidence des changements de flux de cytokinines pendant l'infection de *Vi* sur pommier, potentiellement à l'origine de cette nutrition biotrophe (Ashby 2000). Sachant que la production de  $\beta$ -glucosidase a été démontrée chez *Vi* au moment de l'infection, il est possible d'émettre l'hypothèse que cette enzyme serait à l'origine du clivage de la zéatine-O-glucoside et ainsi du relâchement de zéatine (Ashby 2000). Ce mécanisme serait à l'origine d'accumulation de cytokinines biologiquement actives au niveau de l'entrée du pathogène, résultant en un « puits à nutriments » en translocant les photoassimilats de l'hôte.

## C – Symptômes et méthodes de lutte

### 1 - Symptômes

La tavelure n'entraîne jamais la mort du pommier, mais peut entraîner de fortes pertes économiques car la moindre infection sur le fruit détériore l'aspect visuel de ce dernier et le rend impropre à la commercialisation. Les symptômes de la tavelure peuvent apparaître sur les feuilles, fruits, pétioles, sépales, fleurs, jeunes pousses et bourgeons (MacHardy et al., 2011). De plus, les symptômes évoluent en fonction de la saison et de l'âge des organes de l'hôte. Au printemps sur les feuilles, ils se caractérisent par des petites taches diffuses circulaires veloutées de quelques millimètres de diamètre (4-6 mm) et de couleur marron noire sur la face supérieure du limbe le long des nervures principales et secondaires, puis les feuilles se dessèchent, nécrosent et tombent (Bowen et al., 2011) (Figure 4).

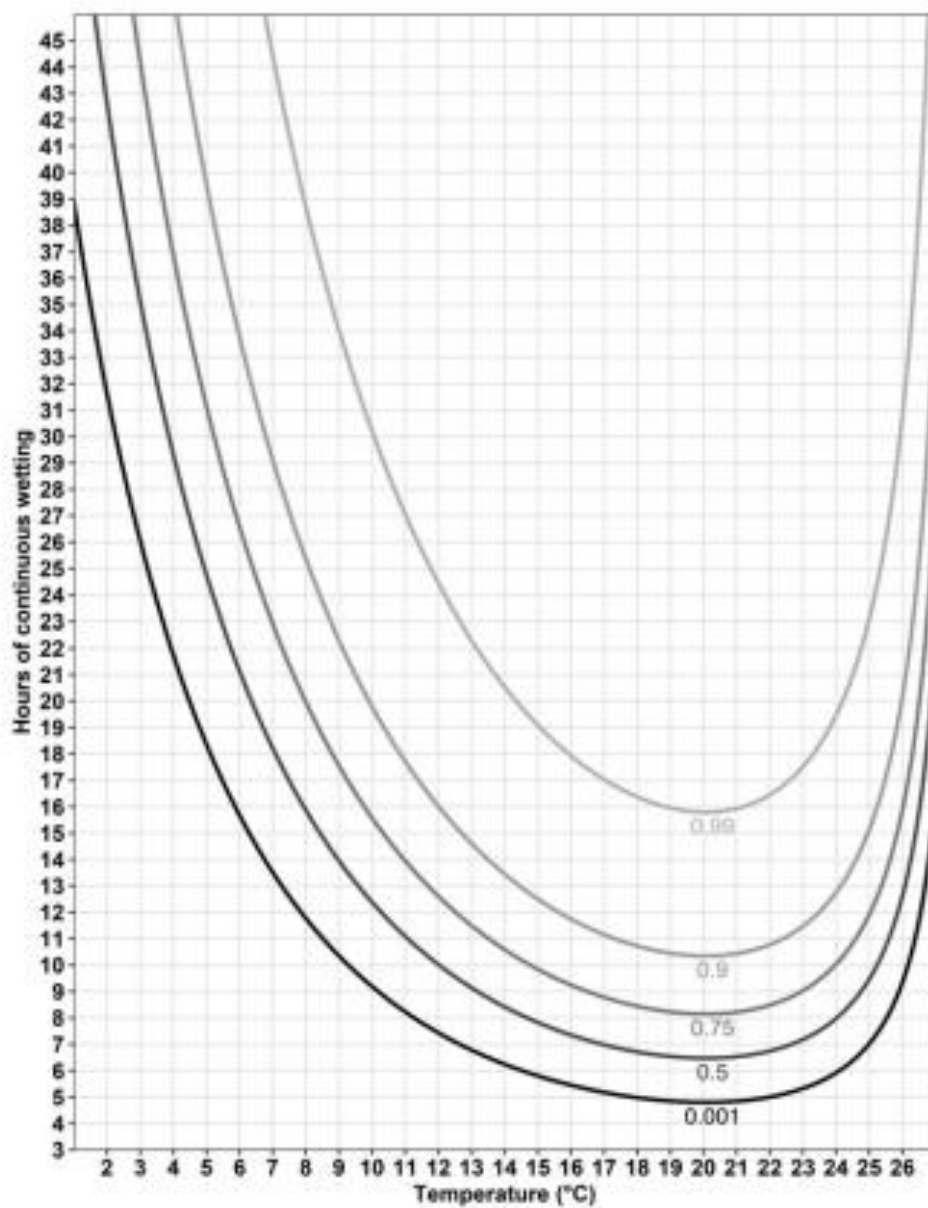


Figure 3 : Proportion d'ascospores de *Venturia inaequalis* résultant en une infection en fonction du temps d'humectation et de la température pendant l'infection (Philion et al., 2020)

En été, les feuilles présentent un aspect flétri et boursoufflé. A l'automne puis au printemps, les bourgeons (à bois et à fleurs) peuvent présenter des taches localisées à la partie libre des écailles, correspondant au développement du stroma par *Vi*. La tavelure peut aussi toucher les fleurs, entraînant dans certains cas leur dessèchement et leur chute, limitant ainsi le futur rendement. Enfin, la tavelure entraîne également des taches sur le fruit dès le mois de mai, pouvant se développer en croûtes noirâtres et liégeuses, déformant ainsi l'épiderme du fruit (Jha et al., 2009).

## 2 - Méthodes de lutte

### 2.1 - Utilisation de fongicides

L'utilisation de fongicides aujourd'hui est la méthode la plus répandue dans le monde pour lutter contre la tavelure du pommier, nécessitant l'application d'une quinzaine/vingtaine de traitements par an (Gladieux 2010). L'utilisation massive et répétée de fongicides a des conséquences très néfastes pour l'environnement (pollution, résidus..). De plus, l'un des problèmes majeurs est l'apparition de résistances ou d'une réduction de la sensibilité aux fongicides à cible unique (Cordero-Limon et al., 2021). Par exemple, le myclobutanil (Sythane) est l'un des fongicides le plus utilisé dans le monde ; c'est un fongicide uni-site inhibiteur de déméthylation (C-14 déméthylase) de la synthèse des stérols, pour lequel des résistances ont été observées depuis 1991 (Chapman et al., 2011). Les champignons, soumis à des pressions de sélection, peuvent muter à un seul gène à l'origine de l'apparition de résistance à un fongicide uni-site (résistance chromosomique mono-génique). De plus, (Cordero-Limon et al., 2021) ont démontré une résistance croisée (mécanisme conférant une résistance à tous les fongicides agissant sur la même cible) entre le myclobutanil (Sythane) et le tebuconazole (Horizon Arbo) (un autre DMI). L'apparition de résistance chez les microorganismes est fréquente car ces derniers effectuent beaucoup de mitoses, entraînant plus de mutations accidentelles. De plus, *Vi* sporule beaucoup, ce qui augmente encore plus la probabilité d'apparition de résistance. En effet, il a été démontré que des populations de pathogènes possédant un haut potentiel évolutif étaient plus susceptibles de développer des résistances (McDonald et Linde 2002). Comme par exemple les pathogènes ayant un système de reproduction mixte, une grande taille de population effective, un potentiel élevé de flux de génotypes, et un haut taux de mutation, ce qui est le cas de *Vi* (McDonald et Linde 2002).



*Figure 4 : Symptômes de tavelure sur feuille de variété Golden Delicious (Beaucouzé 17/05/23, Pierre Normand)*

## 2.2 - La prophylaxie

La prophylaxie vise à prévenir l'apparition ou la propagation des ennemis de cultures. Dans notre cas, elle consiste à réduire l'inoculum primaire présent dans les feuilles mortes au sol. Il est donc conseillé de broyer la litière foliaire morte au sol (contenant les pseudothèces et les asques) pour limiter le développement de la maladie (Parveaud et al., 2014). De plus, effectuer une taille régulière pour s'assurer d'une bonne pénétration de la lumière du soleil, choisir un bon site offrant plus de six heures de soleil par jour, espacer les arbres adéquatement, sont des bonnes pratiques à réaliser afin de minimiser l'humidité dans l'environnement du pommier et ainsi prévenir la maladie (Jha et al., 2009).

## 2.3 - Résistance variétale

La sélection variétale permet de développer de nouvelles variétés cultivées de plantes. C'est une méthode alternative efficace aux pesticides, respectueuse de l'environnement et de la santé publique. Cette méthode peut être efficace à condition d'implanter une résistance durable chez la variété de pommier, et non pas une résistance reposant sur un seul gène où un contournement de résistance peut rapidement arriver (Pattochi 2020). L'effet d'un gène de résistance n'est pas infini ; on peut par exemple citer le gène de résistance Rlm1 au phoma du colza (causé par *Leptosphaeria maculans*) qui a été contourné en seulement 3 ans en France (Rouxel et al., 2003). La plupart des variétés de pommiers résistants à la tavelure aujourd'hui portent un seul gène de résistance majeur, le gène *Rvi6* (*Vf*), et des isolats de *Vi* virulents se sont développés en Europe et aussi aux Etats-Unis (Pattochi 2020). 17 autres gènes majeurs de résistances ont été identifiés chez le pommier, ainsi que 11 facteurs de résistance quantitative (QTLs) (Bus et al., 2011) ; pour l'instant très peu de présents dans les variétés de pommier. Il a été montré dans des essais expérimentaux que les QTLs peuvent également être contournés par *Vi*.

Une stratégie efficace pour générer des résistances durables est appelée le pyramidage ; elle consiste à associer plusieurs facteurs de résistance au sein d'une même variété, tout cela assisté par marqueurs moléculaire (SAM : sélection assistée par marqueurs). Cela permet de cumuler les QTLs avec les gènes majeurs et ainsi limiter le contournement (Pattochi 2020).

## 2.4 - Les stimulateurs de défense des plantes (SDP)

L'utilisation de stimulateurs de défense des plantes (SDP) est également une méthode pouvant freiner le développement des maladies et diminuer l'utilisation massive de pesticides. Ces éliciteurs sont des produits de synthèse, extraits biologiques ou encore des microorganismes vivants non pathogènes, capables d'induire les défenses des plantes traitées



(Marolleau et al., 2017). À l'inverse des pesticides, les SDP agissent seulement sur la plante et n'ont pas d'activité biocide. La plante perçoit ces molécules comme un signal d'agression et initie ensuite des réactions de défense. Le signal d'infection peut être initié par des éliciteurs généraux mimant un PAMP, ou DAMP (*Pathogen/Damage-Associated Molecular Patterns*), par des analogues hormonaux qui viennent agir directement sur la voie de signalisation hormonale (Marolleau et al., 2017), ou encore par des microorganismes non pathogènes sur leur hôte, mais que ce dernier reconnaît néanmoins (Padmathilake et Fernando 2022). L'acibenzolar-S-méthyl (ASM) est un analogue de l'acide salicylique, commercialisé sous le nom de « Bion® », et est utilisé en tant que SDP sur plusieurs espèces végétales (Warneys et al., 2018). Il a été démontré que l'ASM agit sur le pommier en permettant l'activation de NPR1, la mise en place d'une SAR (résistance systémique acquise) et donc la production de PR protéines, induisant ainsi une protection contre *Vi* (Marolleau et al., 2017 ; Gaucher et al., 2020). Cette molécule sera utilisée durant mon stage en tant que témoin positif, et nous la nommerons Bion.

(Padmathilake et Fernando 2022) ont démontré qu'une inoculation d'une souche peu virulente de *Leptosphaeria biglobosa*, peut stimuler les défenses du colza contre une infection d'une souche virulente de *Leptosphaeria maculans*. En effet, *L. biglobosa* entraîne une inhibition de la croissance de *L. maculans* sur les cotylédons du colza lorsqu'ils sont co-inoculés ou lorsque *L. biglobosa* est inoculé 1 jour avant *L. maculans*. De plus, *L. biglobosa* entraîne une sur-expression de certains gènes de défense comme CHI, RbohD et PR1 (liste non exhaustive).

## 2.5 - Lutte biologique

La lutte biologique correspond à l'utilisation de macro-micros auxiliaires contre des bioagresseurs de cultures, et fait l'objet d'études depuis plus de 50 ans dans le cadre de la lutte contre la tavelure (Carisse et al., 2000). On peut citer l'utilisation du coelomycète *Microsphaeropsis ochracea*, qui présente des caractéristiques intéressantes en termes de lutte contre la tavelure. En effet, (Carisse et al., 2000) ont démontré qu'une application de *M. ochracea* sur des feuilles naturellement tavelées qui ont hiverné sur le sol d'un verger entraînait une réduction de la production d'ascospores allant de 81 à 96%. Cependant, sur des essais de terrain à grand échelle, la réduction de la production d'ascospores était seulement de 75%. C'est pourquoi l'utilisation de ce champignon antagoniste en lutte biologique doit être considérée comme un assainissement, une pratique d'hygiène dans les vergers, et non pas comme remplacement des fongicides pendant la phase d'infection primaire.





On retrouve aussi le basidiomycète *Athelia bombacina* inhibant le développement des pseudothèces de *Vi* (Young et Andrews 1990). Cependant, dans des essais aux champs, l'inhibition a été obtenue seulement avec une grande biomasse de ce champignon (1 kilo à l'état frais / hectare) (MacHardy et al., 2001).

Même si la lutte biologique semble très encourageante et efficace, très peu de produits ont été commercialisés jusque-là. En effet, les antagonistes qui contrôlent un agent pathogène sont rarement efficaces sur le terrain. Cela est dû au pathogène, à l'hôte, à l'antagoniste, à l'environnement et à toutes les interactions qui se produisent entre eux (Lahlali et al., 2022).

## **D - Recherche de nouvelles méthodes de lutte**

### **1 - Résultats initiaux EcoFun**

#### **1.1 - Les formes spéciales de *Venturia***

Le pyracantha est un arbuste de la famille des Rosacées, pouvant présenter des symptômes de tavelure comme le pommier, mais son agent pathogène a été initialement identifié comme une autre espèce *Spiloceae pyracantha*. Il a été démontré que *S. pyracantha* et *Vi* présentent une grande similitude génétique ; en effet, les régions ITS (internal transcriber spacer) de ces deux espèces révèlent une forte homologie (Le Cam et al., 2002). De plus, *Vi* est constitué de différentes populations ayant divergé génétiquement plus ou moins récemment (Gladieux et al., 2010). Le développement de ces populations dans des habitats différents a conduit à des spécialisations d'hôtes, résultat de la pression de sélection. Ainsi, des tests croisés de pouvoir pathogène ont dévoilé que ces espèces présentent une stricte spécificité d'hôte ; *S. pyracantha* infectant le pyracantha et non le pommier, et *V. inaequalis*, infectant le pommier et non le pyracantha (Le Cam et al., 2002). Enfin, l'obtention de pseudothèces fertiles entre ces espèces a été obtenu en condition *in-vitro* (Le Cam et al., 2002). Ces résultats ont amené à la conclusion que *S. pyracantha* et *V. inaequalis* sont deux formes spéciales de la même espèce, nommées respectivement *V. inaequalis f.sp. pyracanthae*, et *V. inaequalis f.sp. pomi* (Le Cam et al., 2002 ; Gladieux et al., 2010). Pour la suite de ce mémoire, nous nommerons les souches de *V. inaequalis f.sp. pyracanthae* PYR et les souches de *Venturia inaequalis f.sp. pomi* POMI.

#### **1.2 - Hybrides (PYR x POMI) non pathogènes sur pommier**

Les ascospores issues des pseudothèces fertiles de différents croisements POMI x PYR ont été isolées en laboratoire. Plus de 200 hybrides ont ensuite été inoculés sur pommier



et pyracantha en conditions contrôlées. Il a été démontré que les hybrides sont pathogènes sur pyracantha et non pathogènes sur pommier (Caffier *et al.*, 2022).

### **1.3 - Effet protecteur de PYR sur pommier quant à une infection par POMI**

L'équipe Ecofun a également proposé l'hypothèse qu'une pulvérisation d'une souche PYR avant l'inoculation d'une souche POMI peut provoquer une baisse de symptômes de tavelure. Cette baisse pourrait s'expliquer par les mécanismes suivants ; soit les souches PYR jouent le rôle de bio-surfactant à la surface des feuilles de pommier et ainsi inhibent le développement des souches POMI par compétition, soit les souches PYR induisent une résistance chez le pommier de façon semblable à *L.biglobosa* sur le colza (cf partie C.2.4).

## **2 - Le projet ENFIN !**

Ces résultats sont à la base du projet ENFIN !, déposé par le laboratoire EcoFun de l'IRHS. Proposé dans un appel à projet dans le cadre du Plan Ecophyto II+, ce projet développe un nouveau concept de lutte biologique sur pommier vis-à-vis de *Vi*, et a pour but d'offrir aux agriculteurs une stratégie de lutte réduisant l'utilisation de fongicides. Cette stratégie est basée sur deux inventions brevetées.

### **2.1 - Invention 1 : Détournement sexuel**

L'invention 1 du projet ENFIN !, en raison de l'absence de pathogénie des hybrides (POMI x PYR) sur pommier, vise à cibler la phase de reproduction sexuée de *Vi*. Une application massive de souches PYR à l'automne en verger sur les feuilles sénescentes de pommier conduira les souches POMI à se croiser avec les souches PYR, ce qui conduira à des descendants non pathogènes sur pommier. Cette stratégie, semblable à celle du mâle stérile chez les insectes, résulterait en une diminution des populations de *Vi* pathogènes sur pommier, étant donné leur caractère téléomorphe.

### **2.2 - Invention 2 : Effet protecteur souche PYR**

L'invention 2 du projet ENFIN !, repose sur la protection du pommier contre *Vi* par application préalable de souches non pathogènes sur pommier et appartenant à la même espèce (souches PYR). Il est proposé de pulvériser des souches PYR sur les feuilles de pommiers lors des projections d'ascospores de POMI au printemps, et en été lors des infections primaires et secondaires.



## **E - Objectif du stage**

### **1 - Mes tâches**

Concernant l'invention 1 : Deux partenaires techniques sont en collaboration avec Ecofun: l'IFPC (Institut Français des Productions Cidricoles) et le CTIFL (Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes). L'expérimentation en verger est le cœur de leur métier. L'unité expérimentale de Sées (IFPC) dans l'Orne, le centre de Lanxade (CTIFL) en Dordogne, le centre de La Morinière (CTIFL) en Maine et Loire, et l'Unité Expérimentale Horticole de l'INRAE à Beaucouzé sont donc impliqués dans le projet ENFIN ! Des inoculations de souches PYR et d'eau ont été réalisées à l'automne 2022 sur des feuilles de pommiers tavelées, dans différents vergers : à Beaucouzé (variété Gala), Sées (variétés Petit Jaune et Judeline), Lanxade (variété Golden), et La Morinière (variété Golden). Après incubation hivernale en palox, les feuilles ont été envoyées au laboratoire Ecofun pour analyse. Mes objectifs seront de déterminer par biologie moléculaire, si les souches PYR inoculées à l'automne 2022 se sont bien installées de façon saprophytique sur la litière foliaire. Ensuite déterminer si les souches PYR ont pu se croiser avec les souches POMI déjà présentes sur les feuilles. Enfin par des tests de pouvoir pathogène en conditions contrôlées, évaluer l'efficacité des traitements PYR réalisés à l'automne 2022 en comparant les quantités de maladies obtenues sur différentes variétés de pommier à partir des ascospores issues des lots de feuilles inoculées avec PYR ou eau, des différents sites. Concernant l'invention 2, l'objectif est de tester l'hypothèse qu'une application préalable de PYR peut induire une protection chez le pommier. Pour cela, des analyses seront réalisés à l'aide d'une puce à faible densité quantitative pour déterminer si l'application de souches PYR induit l'activation des voies de défenses chez le pommier. Puis, des tests d'efficacité en conditions contrôlées seront réalisés, en comparant les quantités de maladies obtenues sur des différentes variétés de pommier, suite à des inoculations de souches PYR suivies d'inoculation d'un mélange de souches POMI pour deux formes d'inoculum (ascospores/conidies).



# MATERIELS ET METHODES

## I – Invention 1 : Détournement sexuel

### A – Travaux réalisés au verger préalablement à mon stage

#### 1 - Description des vergers

La localisation des différents vergers ainsi que les variétés de pommiers associées sont représentées dans le tableau 1. Nous utilisons des variétés de pommier à couteau (Golden Delicious et Gala) ainsi que des variétés de pommier à cidre (Judeline et Petit Jaune). Ces variétés sont considérées comme sensibles à la tavelure. Les vergers sont non traités contre la tavelure ou très peu traités, la présence de tavelure à l'automne 2022 diffère entre les différents vergers (tableau 1).

#### 2 – Traitement de la litière foliaire à l'automne 2022

A l'automne 2022, des feuilles mortes tombées au sol des différents vergers ont été mises sous grilles (Figure 5), puis inoculées par de l'eau ou des souches PYR à 500 000 sp/ml. Selon les vergers, il y a eu 6 ou 7 inoculations entre mi-novembre et mi-janvier (tableau 1). L'inoculation des souches PYR a été réalisée avec un mélange de 4 souches monoconidiennes de collection sélectionnées pour leur bonne capacité de multiplication in vitro et leur aptitude à se croiser avec des souches POMI (tableau 2). Deux souches PYR sont de signe sexuel a, et deux autres de signe sexuel alpha, dans l'objectif que ces souches se croisent avec les souches POMI déjà présentes au verger. Les feuilles ont ensuite été mises dans des palox afin d'éviter la dégradation des feuilles au sol (Figure 5). Les feuilles ont ensuite subi une incubation hivernale à proximité de chacun des vergers.

#### 3 – Maturation des ascospores et logiciel RIMpro

La maturation et les projections d'ascospores étant progressive de mars à juin, nous avons utilisé le logiciel RIMpro pour définir la date d'arrêt de l'incubation extérieure et l'envoi des feuilles au laboratoire Ecofun. Le logiciel RIMPro est un outil d'aide à la décision utilisé en arboriculture (notamment pour la tavelure) pour une utilisation raisonnée des pesticides. Ce logiciel est un modèle prédictif se basant sur l'épidémiologie de la maladie (maturation des ascospores, conditions et intensité des éjections, infection des arbres) et les données météo d'une parcelle donnée (température, humidité, humectation foliaire). Il va alors nous apporter des informations sur les stocks d'ascospores immatures, matures et éjectées (Figure 6).

*Tableau 1 : Description des vergers de pommiers*

Sites/Organismes	Variétés	Nb applications PYR et EAU	Dates d'application	Pourcentage de pousses tavelées à l'automne 2022
<b>Beaucouzé (UEH INRAE)</b>	Gala	6	18/11/22. 25/11/22. 29/11/22. 1/12/23. 9/1/23. 13/12/23	100
<b>Lanxade (CITFL)</b>	Golden	7	18/11/22. 25/11/23. 2/12/23. 9/12/23. 14/12/23. 3/01/23. 10/01/23	92
<b>La Morinière (CITFL)</b>	Golden	6	18/11/22. 25/11/22. 9/12/22. 14/12/22. 20/12/22. 22/12/22.	17
<b>Sées (IFPC)</b>	Judeline	7	21/11/22. 25/11/22. 28/11/22. 06/12/22. 19/12/22. 21/12/23. 03/01/23	98
	Petit Jaune			60

*Tableau 2 : Description des souches PYR (Venturia inaequalis f.sp pyracanthae) utilisées*

Forme spéciale	Nom de la souche	Origine	Date échantillonnage	Signe sexuel
PYR	1381	France	01/07/98	a
PYR	1383	France	01/08/98	a
PYR	1387	France	01/08/98	alpha
PYR	2299	France	01/12/04	alpha



*Figure 5 : Dispositif des litières foliaires de pommier sous grilles et palox utilisé pour l'incubation hivernale (La Morinière, automne 2022, Anne Duval-Chaboussou)*



En début de saison, 100% des ascospores sont immatures, et à mesure que la saison progresse, les ascospores arrivent à maturité et sont éjectées lors des pluies.

Dans le cadre de mon stage, nous utilisons ce logiciel pour suivre la maturation et la projection des ascospores. Si un fort épisode pluvieux et une forte projection est prédite, nous rangeons les grilles à l'abri de la pluie pour empêcher une forte perte du stock d'ascospores, puis nous les remettons en incubation dans les palox après l'épisode pluvieux.

Il y a eu 3 envois de feuilles : le 1<sup>er</sup> au début de maturation des pseudothèces (lot 1), le 2<sup>ème</sup> quand 30% des ascospores ont été éjectées (lot 2), le 3<sup>ème</sup> quand 60% des ascospores ont été éjectées (lot 3). Dans le cadre de mon stage, seul l'envoi de la litière foliaire correspondant à 30% d'ascospores éjectées (lot 2) a été analysé. Le tableau 3 représente les dates d'envoi du 2<sup>ème</sup> lot de feuille pour chacun des vergers.

## **B – Travaux réalisés pendant mon stage**

### **1 – Analyse moléculaire des litières foliaires**

Ici nous cherchons à déterminer par PCR si les inoculations des souches PYR ont conduit à leur installation sur la litière foliaire sous forme de colonisation saprophytique. Pour cela, nous utilisons des amorces spécifiques des souches PYR pour déterminer si PYR est détecté sur la litière foliaire suite à la période d'incubation en extérieur. Nous avons également comme objectif de déterminer si les souches PYR se sont croisées avec les souches POMI, mais cela n'a pu être réalisé par manque de temps.

#### **1.1 – Extraction ADN**

Après réception des litières foliaires des différents vergers, des disques foliaires sont prélevés à raison de 10 par tube d'Eppendorf 2mL et placés dans de l'azote liquide. Des billes de broyage acier inox Retsch™ (Ø 5 mm) sont ajoutées (3/tube), et servent au broyage de la litière foliaire par agitation des tubes encore congelés à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch MM400). Le kit d'extraction d'ADN Nucleospin DNA Food (Macherey-Nagel) est utilisé, et la concentration en ADN est mesurée au NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

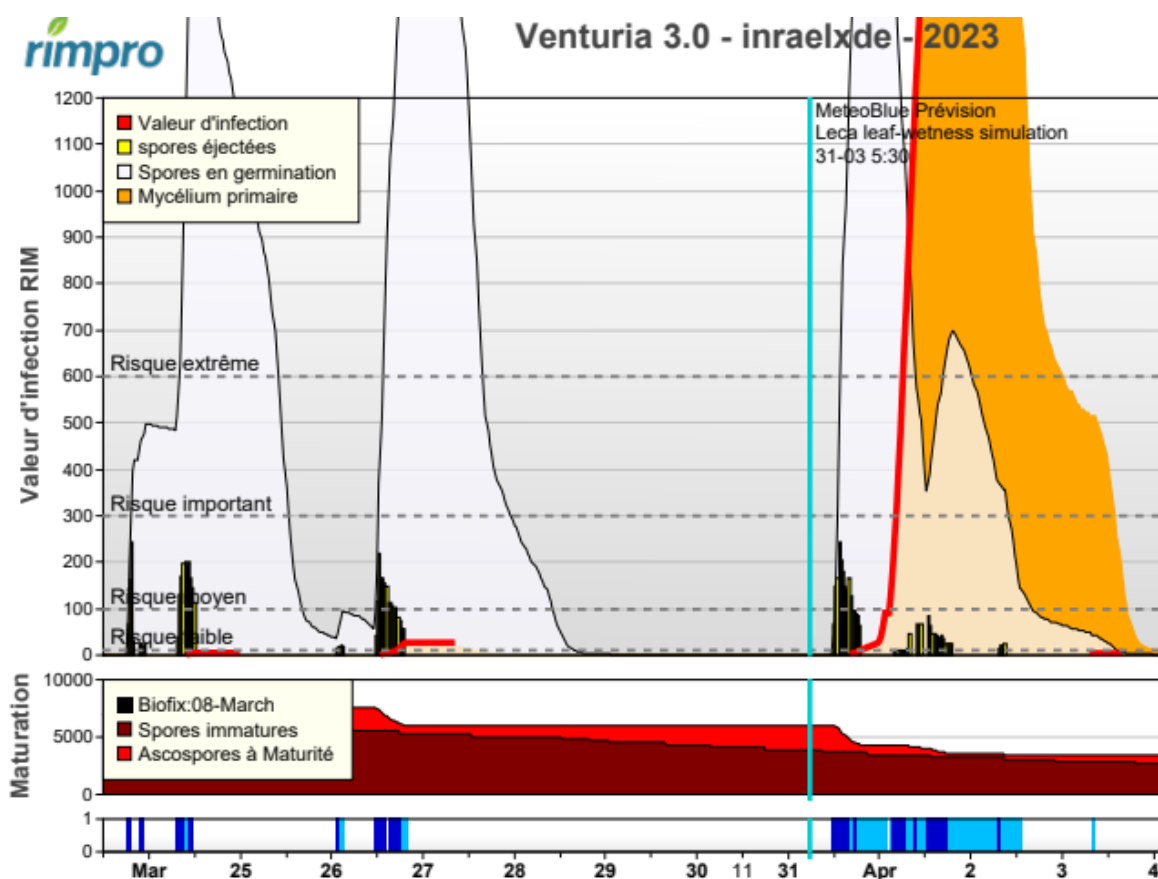


Figure 6 : Sortie RIMpro lors de l'envoi du lot 2 du site de Lanxade (zones bleu foncé : longueur de la pluie, zone bleu clair : longueur de la période d'humectation ; source : rimpro.eu)

Tableau 3 : Dates d'envoi du lot 2 des litières foliaires de pommier des différents sites

Sites	Dates d'envoi (2 <sup>ème</sup> envoi)
Beaucouzé	06/04/23
Lanxade	24/04/23
La Morinière	26/03/23
Sées	24/04/23

## **1.2 – PCR**

Les PCR sont effectuées sur les ADN préalablement dilués à 5 µg/µl. Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µL contenant 14,8 µL d'eau filtrée stérilement, 5,25 µL de tampon (Green GoTaq reaction buffer, 7,5mM MgCl<sub>2</sub>, pH =8 ; Promega), 1,05 µL de dNTP (10mM), 1,3 µL de chaque amorce (Forward 5'-3' : GGG GGT GTG GTT ACA TTC AG ; Reverse 5'-3' : CT GCA ACT ACA ACC GCG TA) (10µM), et 0,13 µL de Taq polymérase (GoTaq G2 DNA polymerase, Promega). Le programme PCR est le suivant : 1. dénaturation initiale à 95°C 3 min, 2. 95°C 0.03min, 3. 60°C 0.03min, 4. 72°C 0.03min, 5. Retour à l'étape 2 pour 34 fois, 6. 72°C 5min. Les produits d'amplifications ont été résolus sur des gels d'agarose 2% dans du tampon 1X TAE (89mM Tris-acetate, 89mM acide borique, 2mM EDTA, PH = 8,3), suivi d'une révélation au bromure d'éthidium.

## **2 – Test d'efficacité de l'invention 1**

L'objectif est de comparer les quantités de tavelures obtenues sur différentes variétés de pommier à partir d'ascospores issues des litières foliaires inoculées par des souches PYR ou par de l'eau, provenant des différents vergers de : Beaucouzé, Lanxade, La Morinière et Sées. Si des croisements se sont produits entre les souches PYR et des souches POMI, les ascospores résultantes devraient être non pathogènes sur pommier, ce qui devrait se traduire par une quantité plus faible de maladie pour la modalité PYR que pour la modalité EAU.

### **1 – Matériels biologiques**

#### **1.1 - Plantes**

Les plantes utilisées sont des pommiers greffés des variétés « Golden Delicious » et « Gala » (pommier à couteau), ainsi que « Judeline » et «Petit Jaune » (pommier à cidre), avec un porte greffe MM106 utilisé pour sa vigueur. On utilise ici les mêmes variétés que celles des vergers. Les plantes ont été élevées en serre, avec des températures variant entre 22°C et 24°C et avec un taux d'humidité moyen de 70%.

#### **1.2 - Souches**

Les souches proviennent des litières foliaires des différentes variétés de pommiers des différents sites représentés dans le tableau 1, avec 2 modalités pour chaque verger : PYR et EAU.

## **2 – Conduite expérimentale**

Deux expérimentations sont effectuées : l'une sur pommiers à cidre et l'autre sur pommiers à couteau.

*Tableau 4 : Concentrations (sp/ml) des suspensions d'ascospores issues des litières foliaires de pommier pour les tests d'efficacité de l'invention 1*

Sites/Variété	Origine Ascospores	
	Modalité « PYR » (sp/ml)	Modalité « EAU » (sp/ml)
<b>Beaucouzé (Gala)</b>	<b>32 500</b>	<b>37 000</b>
<b>Lanxade (Golden)</b>	<b>19 000</b>	<b>16 500</b>
<b>Morinière (Golden)</b>	<b>3 000</b>	<b>2 000</b>
<b>Sées (Judeline)</b>	<b>14 000</b>	<b>14 000</b>
<b>Sées (Petit Jaune)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>



*Figure 7 : Dispositif de bâches et de cloisons en salle climatisée pour les tests d'efficacité (Beaucouzé 17/05/23, Pierre Normand)*

## **2.1 - Préparation des plants**

La veille de l'inoculation, les plants sélectionnés (croissance active) sont labélisés (fine ficelle blanche placée autour du pétiole de la plus jeune feuille poussante) en serre. Cela nous permet de repérer les feuilles à noter pour suivre le développement de la tavelure après inoculation. Les plants sont ensuite transférés en salle climatisée, et placés est 4 blocs pour chacun des sites. Chaque bloc comprend 6 plants de chaque variété pour chacune des 2 modalités PYR et EAU. Des cloisons sont placées entre chaque compartiment d'inoculation (une modalité de chaque bloc) ainsi qu'une bâche, afin d'éviter la contamination entre les compartiments (Figure 7). Au total nous avons donc 24 plants de chaque variété par modalité pour chacun des sites.

## **2.2 - Préparation des suspensions d'ascospores**

Pour chacune des modalités de chaque bloc, 0.5g de feuilles est déposé dans un tube Falcon 50ml avec 25ml d'eau, puis 10s de vortex est effectué tous les quarts d'heure pendant 1h afin de provoquer l'éjection des ascospores hors des pseudothèces pour les mettre en suspension. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une compresse et la concentration est estimée à la cellule de Malassez (Rogo Sampaic, 0.22mm), en effectuant 4 comptages de 25 rectangles quadrillés. Les concentrations des différents inocula sont représentées dans le tableau 4. La variété « Petit Jaune » a été exclue de l'expérimentation sur pommier à cidre, car nous n'avons pas pu récupérer d'ascospores. Pour la variété « Judeline » nous n'avons pas obtenu un volume de suspension suffisant et nous n'avons pu inoculer que 2 blocs au lieu de 4.

## **2.3 – L'inoculation**

Lors de l'inoculation, un compartiment correspondant à une suspension d'ascospores à inoculer, est débâchée. La pulvérisation se fait avec un compresseur à l'aide d'une tête de pulvérisation en verre que l'on plonge dans le tube contenant la suspension. Environ 2ml de suspension sont inoculés sur chaque plante. Une fois qu'un compartiment est inoculé, il est rabâché ; puis le compartiment suivant est débâché et ainsi de suite pour chaque compartiment. Quand tous les compartiments sont inoculés, un bâchage général de l'ensemble des compartiments est effectué afin de maintenir l'humectation du feuillage.

## **2.4 - Les conditions de la cellule climatique**

Les conditions climatiques de la salle climatisée (tableau 5) sont favorables au développement de la tavelure, avec une température de 17°C, et une humidité relative de 95% permettant de maintenir le feuillage humecté pendant 48h après inoculation.

Tableau 5 : Conditions de la cellule climatique pour les tests d'efficacité des inventions 1 et 2

Etapes	Conditions
Avant inoculation	17°C, 12h de jour de 8h30 à 20h30, 80% HR 17°C, 12h de nuit de 20h30 à 8h30, 90% HR
Période d'humectation 48h après inoculation	<i>Bâchage général</i> 17°C, obscurité, 95% HR, flux d'air au minimum
Période d'incubation	17°C, 12h de jour de 8h30 à 20h30, 80% HR, 17°C, 12h de nuit de 20h30 h à 8h30, 90% HR

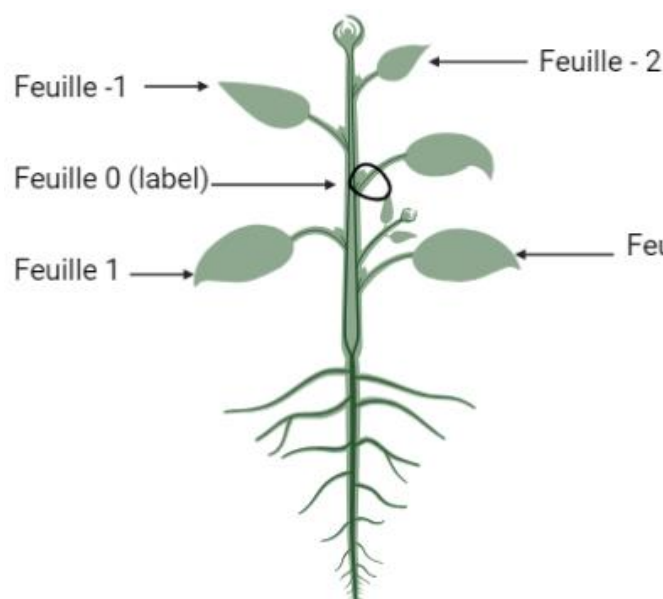


Figure 8 : Schéma représentatif des feuilles de pommier sur lesquelles sont notés les symptômes de tavelure

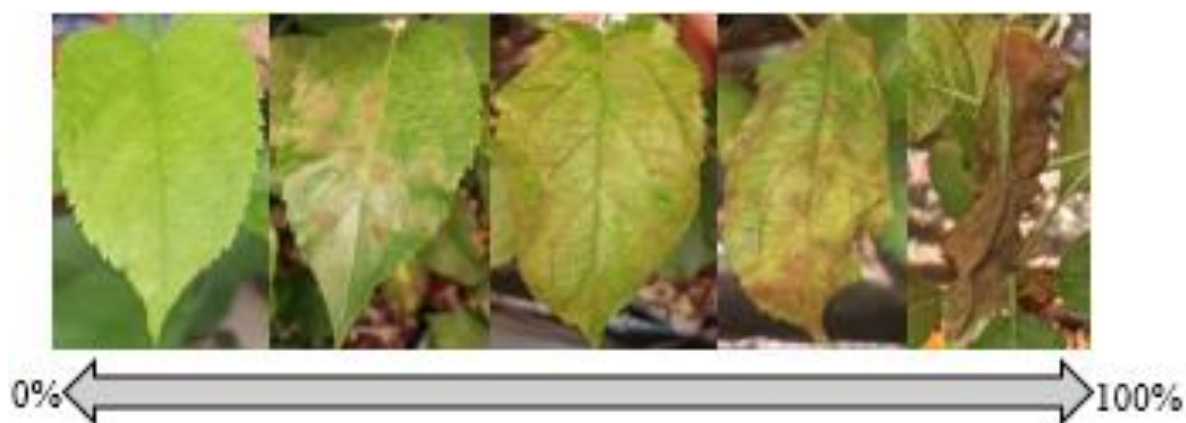


Figure 9 : Exemples de feuilles de pommier présentant différents pourcentages de surface tavelée entre 0 à 100 % (Beaucouzé 17/05/23, Pierre Normand)

## 2.5 - La notation de symptômes

Plusieurs notations de symptômes (entre J10 et J24 après inoculation) sont effectuées afin d'effectuer une cinétique du développement de la maladie. Pour cela, on note visuellement la sévérité des symptômes en pourcentage de surface foliaire tavelée sur 5 feuilles pour chaque plante (Figure 8). L'échelle de notation des symptômes couvre la gamme de 0 à 100% de surface foliaire tavelée de 10% en 10% (Figure 9).

## 2.6 - Analyse et statistiques

Les cinétiques sont effectuées à partir de la moyenne du pourcentage de maladie des 4 feuilles les plus tavelées par plante en fonction des jours post inoculation. L'AUDPC (Area Under Disease Progression Curve / aire sous la courbe de progression de la maladie) est calculée pour chaque plante à partir des cinétiques. Considérons 3 dates de notations de données (J10, J13 et J16). L'AUDPC est calculée comme ceci :  $AUDPC = 0,5 * ((13-10) * (\% \text{ tavelure J10} + \% \text{ tavelure J13}) + (16-13) * (\% \text{ tavelure J13} + \% \text{ tavelure J16}))$ .

Pour chaque site, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur (niveau de confiance 95%) a été réalisée à l'aide du logiciel Rstudio, afin d'identifier ou non un effet significatif des modalités (PYR ou EAU) sur trois variables : pourcentage de tavelure à 21 DPI (Days Post Infection) pour l'expérimentation sur pommier à couteau, à 23 DPI pour l'expérimentation sur pommier à cidre et l'AUDPC. Un test de normalité (Shapiro-Wilk) et d'homogénéité des variances (Levene) des résidus ont été effectués pour vérifier les bonnes conditions d'application de l'ANOVA.

# II – Invention 2 : Effet protecteur des souches PYR

## A – Capacité à induire les défenses du pommier

L'objectif de ce test est de déterminer si les souches PYR peuvent induire des voies de défenses chez le pommier. Pour cela, deux inoculations de souche PYR, de Bion et d'eau sont réalisées à 4 jours d'intervalle sur pommier, puis des échantillons de feuilles sont prélevés pour analyse par qPFD. Le Bion étant un analogue de l'acide salicylique, il nous sert de contrôle positif.

La qPFD est un outil moléculaire qui a été breveté (brevet INRA WO 2011/161388) par l'équipe Respom de l'IRHS de Beaucoz. Cette puce à faible densité quantitative permet de déterminer le niveau d'expression de 29 gènes de défense par qPCR (Polymerase Chain Reaction Quantitative) dans un échantillon de pommier. Les gènes cibles sont indiqués dans le

Tableau 6 : Liste des 29 gènes de défense du pommier étudiés par qPFD

	Classes et sous-classes de défense	Gènes de défense	
		Abbréviation	Famille de gène
Barrières chimiques et/ou physiques	Protéines PR	PR-1	Cysteine-rich secretory protein
		PR-2	Glycosyl hydrolase family 17
		PR-4	Barwin domain protein
		PR-5	Thaumatococcus
		PR-8	Chitinase A/Glycosyl hydrolase family 18
		PR-14	Protease inhibitor/seed storage/LTP family
		PR-10	Bet v1, Mal d1 family
	Assimilé à une protéine PR	AGG	Agglutinine
	Produits phénoliques	PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
		CHS	Chalcone synthase
		DFR	Dihydroflavonol reductase
		BIS 2	Biphenyl synthase
		PPO	Polyphenol oxidase
	Terpénoides	HMGR	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase
		FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
		Far	(E,E)-alpha-farnesene synthase
	Cystéine sulfoxide	CLS	Cystéine lyase
	Stress oxydant	Apox	Ascorbate peroxidase
		GST	Glutathion-S-transferase
		POX	Peroxidase
	Modifications pariétales	CalS	Callose synthase
		Pect	Pectin methyl esterase
		CAD	Cinnamyl alcohol dehydrogenase
Signalisation hormonale	Voie de l'acide salicylique	EDS1	Disease resistant protein EDS1
		WRKY	WRKY transcription factor 30
	Voie de l'acide jasmonique	Lox2	Lipoxygenase AtLOX2
		JAR	Jasmonate resistant 1
	Voie de l'éthylène	ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
		EIN3	EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1



tableau 6. Cet outil se présente sous forme d'une plaque PCR 96-puits contenant les amorces déshydratées des 29 gènes de défense et de 3 gènes de référence (afin de normaliser les quantités d'ADNc entre échantillon), en 3 exemplaires. Ceci nous permet d'analyser par qPCR un échantillon d'ARN (acide ribonucléique) de pommier rétro-transcrit en ADN (acide désoxyribonucléique), préalablement mélangé à un mix SYBR®Green (agent fluorescent intercalant permettant la quantification de l'ADN amplifié) et distribué sur l'ensemble de la plaque. Les résultats sont des quantifications relatives d'expression des 29 gènes cibles dans les échantillons des tissus ayant reçu les inoculations par rapport à l'échantillon témoin (eau).

## **1 - Matériels biologiques**

### **1.1 - Souches**

La souche utilisée est la souche PYR 1381 (Tableau 2). Deux concentrations ont été utilisées : 400 000 spores/ml et 1 500 000 spores/ml.

### **1.2 – Plantes**

Pour ces tests qPFD nous travaillons avec des semis de pommier. Les pépins proviennent de la pollinisation libre de la variété « Golden Delicious ». Les semis sont placés en mini-serre (Figure 10).

## **2 – Conduite expérimentale**

Cette manipulation a été effectuée 2 fois de manière indépendante en serre.

### **2.1 - Préparation des plants**

Les plants sont placés la veille de l'inoculation dans des mini-serres (12 par mini-serre) dans une serre climatisée.

### **2.2 - Préparation des suspensions de spores**

La souche PYR est multipliée sur feuilles de cellophane déposée sur milieu PDA (potato dextrose agar 39 g L<sup>-1</sup>) additionné d'extrait de levure (3 g L<sup>-1</sup>) en boîte de Pétri ronde (Fisherbrand® 90mm x 16.2mm. Après autoclavage (121°C, 15min), les milieux sont coulés sur boîte de Pétri sous hotte à flux laminaire, et séchés la nuit sous hotte. Puis une feuille de cellophane est déposée dans chaque boîte de Pétri.

Afin de multiplier la souche PYR, nous utilisons une feuille de cellophane conservée au congélateur à -20 °C sur laquelle la souche était présente sous forme de conidie. Après agitation manuelle du cellophane dans un pot contenant de l'eau stérile, les spores se décollent et nous obtenons une suspension de conidies. 200µL de suspension des spores sont ensuite déposées



*Figure 10 : Dispositif des semis issus de pépins de pommier de Golden Delicious en mini-serre (Beaucouzé 04/04/23, Pierre Normand)*



*Figure 11 : Compteur de particules (coulter counter) utilisé pour estimer la concentration en spores (Beaucouzé 03/03/23, Pierre Normand)*

sur des feuilles de cellophane de manière homogène sous hotte. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées dans une cellule climatique à 17°C sous lumière blanche (36W) avec une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit durant une semaine environ. Après le développement de la souche sur boîtes de Pétri, les feuilles de cellophane sont récupérées et agitées manuellement dans un pot contenant de l'eau stérile (la quantité d'eau dépend de la quantité de plantes à inoculer). Après agitation, le contenant du pot est ensuite filtré dans un tube Falcon 50mL à l'aide d'une compresse. Après agitation du tube, 80µL de la suspension sont déposés dans une accuvette (Beckman Coulter Accuvette™ ST Sampling Vials with Caps, 25mL, récipient utilisée pour la lecture de la concentration des échantillons) contenant 8mL d'isoton (électrolyte). Pour chaque suspension, deux accuvettes sont préparées, et deux mesures de concentration (sp/ml) sont faites par accuvette à l'aide d'un compteur de particules (Figure 11) (Beckman, Z2 coulter counter). Cet appareil détermine, en fonction de leurs dimensions, le nombre de particules en suspension dans un électrolyte. Le compteur détecte un changement de résistance électrique lorsqu'on fait passer un électrolyte contenant des particules (ici des spores) à travers une petite ouverture ; cette variation de résistance électrique dépend de la taille des particules. Ce compteur de spores est calibré pour les conidies de *Vi*. Puis les concentrations sont ajustées à 400 000 sp/ml et 1 500 000 sp/ml. Enfin, pour vérifier la viabilité de l'inoculum, un taux de germination est effectué. 20µL d'une suspension sont déposés sur une boîte de Pétri contenant du milieu PDA, puis 24h à 48h plus tard, le nombre de spores germées et non germées sont comptées au microscope.

### **2.3 - Inoculation**

24mL de suspension sont inoculés par mini-serre/modalité (Eau, PYR 400 000 sp/ml, PYR 1 500 000 sp/ml, Bion 0,4 g/L) à l'aide d'un pulvérisateur manuel, puis une seconde inoculation a lieu 4 jours plus tard.

### **2.4 - Les conditions de la serre climatique**

Le tableau 7 indique les conditions climatiques lors des deux expérimentations.

### **2.5 – Prélèvement, Extraction d'ARN, Retrotranscriptase**

Un prélèvement de disques foliaires (10 disques foliaires/5 plants) a lieu 3 jours après la seconde inoculation (J+3). Ils sont plongés dans de l'azote liquide directement afin de stopper les réactions biologiques et éviter une dégradation de l'ARN, puis maintenus à -80 °C. Pour l'extraction de l'ARN, des billes de broyage acier inox Retsch™ (Ø 5 mm) sont préalablement placées dans les tubes de prélèvements, et servent au broyage des feuilles par agitation des tubes

*Tableau 7 : Température et hygrométrie ambiante lors des deux expérimentations qPFD de l'invention 2(avec minimum et maximum entre parenthèses)*

	<b>Température °C</b>	<b>Hygrométrie ambiante %</b>
<b>Expérience 1</b>	15-25	30-70
<b>Expérience 2</b>	15-23	65-95

encore congelés à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch MM400). Le kit d'extraction NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel) a été utilisé (Annexe I), et les ARN sont dosés au NanoDrop (ThermoFisher Scientific). La rétrotranscriptase (Annexe II et III), nous permet ensuite de reconstituer notre ADN complémentaire, plus stable et amplifiable. Enfin, une PCR de vérification est utilisée pour vérifier l'absence d'ADN génomique : une migration des amplifications par électrophorèse est effectuée sur gel d'agarose à 1%.

## 2.6 – Préparations des amorces et qPCR

Afin de mesurer l'expression relative des gènes étudiés, nous réalisons des réactions de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR). Nous utilisons des plaques 96 puits où nous plaçons 13µL de mix ainsi que 3µL de nos ADNc dilués au 1/20<sup>ème</sup> (Figure 12). Le mix est constitué de Mesa blue qPCR Master Mix (Eurogentec), des amorces et d'eau ultra pure. Les amorces sont préalablement diluées à une concentration spécifique en fonction du gène étudié. Le cycle d'amplification utilisé est le suivant : 1. 95°C 5min, 2. 95°C 0.03min, 3. 60°C 1 min, 4. retour à l'étape 2 pour 39 fois, 5. 55°C 0.05min, 6. 95°C 0,5°C/cycle. Chaque échantillon est disposé sur une plaque, avec les amorces en triplicata.

## 2.7 – Analyse

A la fin du cycle, nous obtenons les données de quantification Ct. Il correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne un seuil de quantification. Nous appliquons la méthode de calcul  $\Delta\Delta Ct$  indiquée ci-dessous (Vandesompele et al., 2002).

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

Ensuite, la quantification relative est calculée :  $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Une analyse en composantes principales a ensuite été effectuée sur Rstudio (package Factoextra et FactoMineR) afin d'interpréter et visualiser plus facilement les 32 variables quantitatives. En effet, les variables sont transformées en nouvelles variables décorrélatées les unes des autres que l'on appelle composantes principales. On garde les deux premières composantes cumulant une grande portion de la variabilité totale de notre jeu de données. Ces deux composantes principales forment une nouvelle matrice en deux dimensions. Nous récupérons ensuite les coordonnées de chaque échantillon sur ces deux dimensions et effectuons une représentation en nuage de points.

## B – Test d'efficacité de l'invention 2

L'objectif est de tester l'hypothèse que des applications préalables de PYR peuvent induire une protection chez le pommier. Pour cela, deux inoculations à 4 jours d'intervalle, de

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PR-1	PR-1	PR-1	PR-2	PR-2	PR-2	PR-4	PR-4	PR-4	PR-5	PR-5	PR-5
B	PR-8	PR-8	PR-8	PR-14	PR-14	PR-14	PR-10	PR-10	PR-10	PAL	PAL	PAL
C	CHS	CHS	CHS	DFR	DFR	DFR	BIS2	BIS2	BIS2	PPO	PPO	PPO
D	HGMR	HGMR	HGMR	FPPS	FPPS	FPPS	FAR	FAR	FAR	CLS	CLS	CLS
E	APOX	APOX	APOX	GST	GST	GST	POX	POX	POX	CalS	CalS	CalS
F	PECT	PECT	PECT	CAD	CAD	CAD	EDS1	EDS1	EDS1	WRKY	WRKY	WRKY
G	LOX2	LOX2	LOX2	JAR	JAR	JAR	ACOO	ACOO	ACOO	EIN3	EIN3	EIN3
H	AGG	AGG	AGG	TuA	TuA	TuA	Actin	Actin	Actin	GADPH	GADPH	GADPH

*Figure 12 : Exemple de plan de plaque 96 puits utilisé en qPFD*

souches PYR, d'eau, et de Bion suivis d'inoculations de souches POMI sont réalisées sur trois variétés de pommier. Le pourcentage de maladie est ensuite évalué.

## **1 – Matériels biologiques**

### **1.1 – Plantes**

Cf partie « I - B - 2 - 1.2 » du Matériels et Méthodes. De plus, nous rajoutons des plants de pyracantha (variété sensible Orange Charmer) pour contrôler les inoculations de PYR.

### **1.2 - Souches**

4 souches PYR monoconidiennes de collection (les mêmes que pour l'inoculation de PYR dans les différents vergers à l'automne 2022 de l'invention 1), ainsi que des souches POMI sont utilisées. Les souches POMI sont des inocula en vrac échantillonnés dans des vergers infectés naturellement par la tavelure (Tableau 8), sous forme de conidie (feuilles récoltées en fin d'infection primaire) ou sous formes d'ascospores (litière foliaire récoltée au printemps). Nous utilisons des inocula en vrac afin d'avoir une meilleure représentation de la diversité des souches POMI dans un verger.

## **2 – Conduite expérimentale**

Deux expérimentations sont réalisées, l'une sur pommiers à couteau (« Gala » et « Golden Delicious »), l'autre sur pommier à cidre (« Judeline »).

### **2.1 – Préparations des suspensions de spores**

Les souches PYR ont été préparées de la même manière que la partie « II - A - 2.2 ». Les inocula conidies et ascospores POMI en vrac ont été préparés de la même façon que la partie « I - B - 2 - 2.1 ». Un mélange de 4 souches PYR concentré à 400 000 sp/ml a été effectué pour l'expérimentation sur pommier à couteau. Une seule souche PYR (1381) concentrée à 1 500 000 sp/ml a été utilisée pour l'expérimentation sur pommier à cidre (Tableau 8).

### **2.2 - Préparation des plants**

Cf partie « I - B - 2 - 2.1 » du Matériels et Méthodes. Pour chaque inoculum POMI, les plants sont répartis en 3 blocs avec 6 plants de chaque variété pour chacune des modalités PYR, EAU et Bion. Nous avons 18 « Golden Delicious », 18 « Gala » et 18 pyracantha par modalité.

### **2.3 – Inoculation, conditions de la cellule climatique, notation de symptômes, statistiques**

Il y a eu 2 inoculations de souches PYR à 4 jours d'intervalles, suivi de l'inoculation POMI le lendemain de la deuxième inoculation PYR. Cf tableau 5 pour les conditions climatiques. Cf partie « I - B - 2 - 2.5 » pour la notation de symptômes. Cf partie « I - B - 2 - 2.6 pour l'analyse et les statistiques

Tableau 8 : Souches de *Venturia inaequalis* f.sp *pyracanthae* (PYR) et f.sp *pomi* (POMI) utilisées pour les tests d'efficacité de l'invention 2

Type d'inoculum	Nom de la souche	Hôte d'origine	Lieu d'origine	Date échantillonnage	Concentrations (sp/ml)	
					1 <sup>ère</sup> expérience	2 <sup>ème</sup> expérience
(PYR)	1381	Pyracantha	France	01/07/98	100 000	1 500 000
PYR	1383	Pyracantha	France	01/08/98	100 000	
PYR	1387	Pyracantha	France	01/08/98	100 000	
PYR	2299	Pyracantha	France	01/12/04	100 000	
POMI conidies vrac		Pommier « Gala »	France (Beaucouzé)	01/07/21	60 000	
POMI ascospores vrac		Pommier « Gala »	France (Beaucouzé)	16/04/21	20 000	
POMI conidies vrac		Pommier « Judeline »	France (Sées)	10/07/19		120 000



# RESULTATS

## I – Invention 1 : Détournement sexuel

### A – Analyse des litières foliaires

La figure 13 représente une électrophorèse sur gel d'agarose 2% des ADN extraits des litières foliaires modalité EAU ou PYR des sites de Lanxade (« Golden »), Beaucouzé (« Gala »), La Morinière (« Golden »), Sées (« Petit Jaune »), et Sées (« Judeline »), amplifiés par PCR. Nous observons 1 bande à 180pb pour nos contrôles positifs (ADN de *pyracantha* inoculé par PYR et souche PYR monoconidienne de collection 1381) sur les 2 gels A et B réalisés. De plus, 1 bande légère à 180pb est identifiée pour les sites de Lanxade et de Beaucouzé pour la modalité PYR. Aucune bande à 180 pb n'est observée sur le contrôle négatif (eau), sur les modalités EAU, et sur les modalités PYR des sites de La Morinière et de Sées (« Judeline » et « Petit Jaune »). Ainsi, nous détectons bien la forme spéciale de *V. inaequalis f.sp. pyracanthae* PYR dans les litières foliaires traitées avec PYR pour les sites de Beaucouzé et Lanxade. En revanche, nous ne détectons pas PYR pour les sites de La Morinière, et Sées. Cependant, nous observons également des bandes aspécifiques pour la modalité Lanxade EAU, Lanxade PYR, Petit Jaune EAU et Judeline EAU.

### B – Test d'efficacité (invention 1)

#### 1 - Inocula des sites Beaucouzé, Lanxade, La Morinière

La figure 14-A représente le pourcentage de surface foliaire tavelée sur la variété de pommier à couteau « Gala », en fonction des jours post inoculation (DPI) d'ascospores issues des litières foliaires traitées par les modalités EAU ou PYR des différents sites. Nous n'observons pas de différence significative entre les modalités EAU et PYR sur le pourcentage de tavelure pour le site de Beaucouzé (22,8 et 26,2% respectivement) à 21 DPI, ni sur l'AUDPC. Ce constat est identique pour les inocula en provenance de La Morinière (0,5 et 1,8% respectivement) à 21 DPI, et sur l'AUDPC. En revanche, un effet significatif de la modalité PYR est observé sur le pourcentage de tavelure à 21 DPI et sur l'AUDPC pour le site de Lanxade ; les ascospores issues de la litière foliaire traitées par la modalité PYR entraînent significativement moins de maladie que la modalité EAU (3,5 et 6,6% respectivement) à 21 DPI. La figure 14-B représente le pourcentage de surface foliaire tavelée sur la variété de pommier à couteau « Golden Delicious », en fonction des jours post inoculation d'ascospores

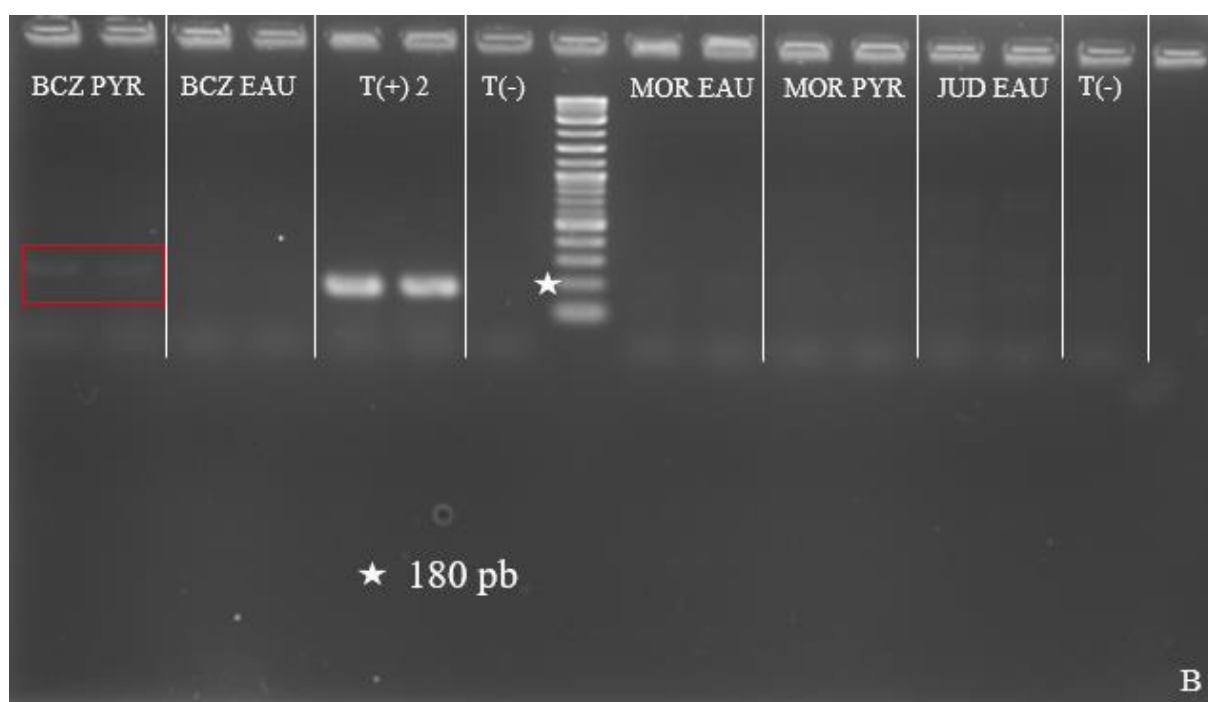
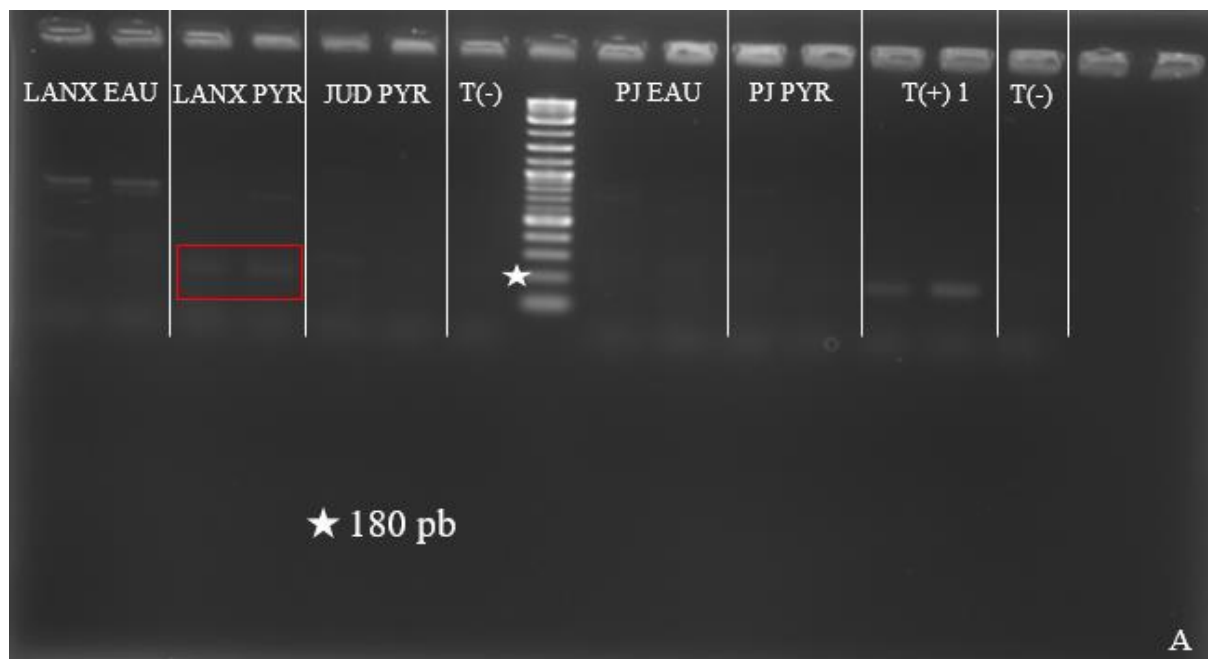


Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des ADN extraits des litières foliaires de pommier inoculées à l'automne 2022 avec les modalités EAU ou PYR (*Venturia inaequalis* f.sp. *pyracantha*), amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Sites : LANX = Lanxade (Golden), BCZ = Beaucouzé (Gala), MOR = La Morinière (Golden), JUD = Sées (Judeline), PJ = Sées (Petit Jaune) ; T(+) 1 : ADN de *pyracantha* inoculé par PYR ; T(+) 2 : Souche monoconidienne de collection 1381 ; T(-) = H20.

issues des litières foliaires traitées par les modalités EAU ou PYR des différents sites. Premièrement, nous observons plus de maladie sur la variété « Golden Delicious » que sur « Gala ». Puis, de même que pour la variété « Gala », nous notons un effet de la modalité PYR sur le pourcentage de surface foliaire tavelée à 21 DPI et sur l'AUDPC seulement pour les inocula provenant du site de Lanxade. Les ascospores issues des litières foliaires de Lanxade traitées par PYR induisent moins de maladie sur la variété « Golden Delicious » que les ascospores issues des litières foliaires traitées par l'eau (8,5 et 13,6% respectivement) à 21 DPI.

## **2 - Inocula du site de Sées**

La figure 14-C représente le pourcentage de surface foliaire tavelée sur la variété de pomme à cidre « Judeline », en fonction des jours post-inoculation d'ascospores issues des feuilles traitées par la modalité EAU ou PYR. Nous n'observons pas de différence significative entre les modalités EAU et PYR sur le pourcentage de surface foliaire tavelée de la variété de pommier à cidre « Judeline » (11,7 et 15,6% respectivement) à 23 DPI, ni sur l'AUDPC.

## **II - Invention 2 : Effet protecteur des souches PYR**

### **A – Capacité à induire les défenses du pommier**

La figure 15 nous montre les expressions relatives des gènes cumulés de différents échantillons J+3 après inoculation comparé au témoin eau de chacune des 2 expériences. Nous remarquons que le Bion induit fortement les gènes de défense du pommier dans les deux manipulations.

Concernant la souche PYR 1381, nous constatons qu'elle aussi induit l'expression des gènes de défense, mais moins fortement que le Bion. Globalement, la souche PYR induit plus fortement les défenses du pommier lors de la 2<sup>nd</sup> expérience que lors de la 1<sup>ère</sup> expérience, cependant, l'interprétation ne change pas entre les deux expériences ; la souche PYR 1381 induit bien les voies de défense du pommier, plus fortement à 1,5 millions sp/ml qu'à 400 000 sp/ml. La figure 16 représente les expressions relatives des gènes en se focalisant sur le Bion et la souche PYR à 1,5 millions sp/ml de la 2<sup>ème</sup> expérience, comparée au témoin eau. Ce graphique nous renseigne plus précisément sur les gènes les plus exprimés. Nous observons des profils très similaires entre le Bion et la souche PYR, avec des inductions d'amplitude moindre pour ce dernier : les protéines PR et la voie de l'acide salicylique sont les plus exprimées. On retrouve les PR1, PR2, PR4, PR8, PR14, PR10, WRKY et EDS1. Nous retrouvons également les gènes

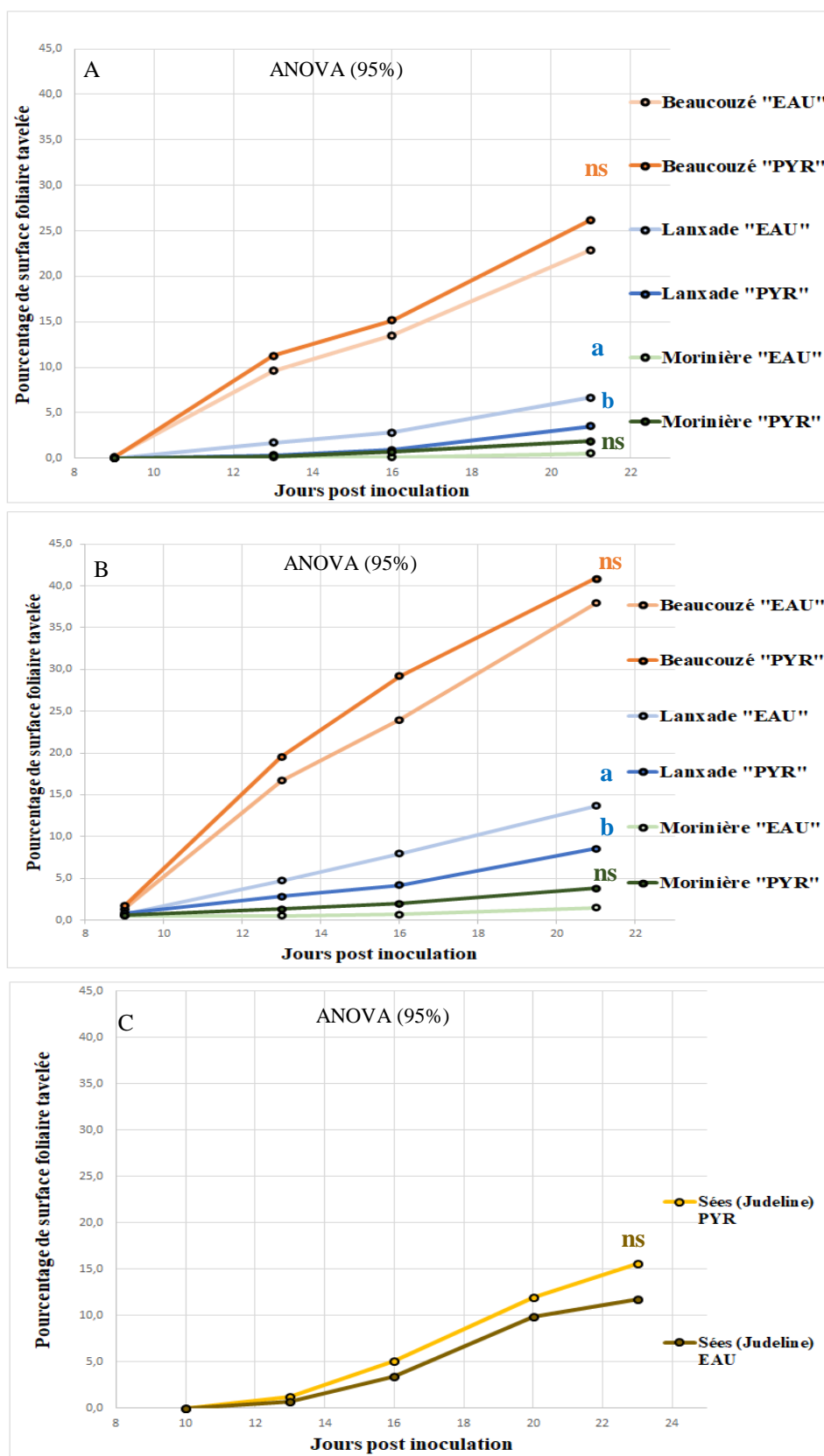


Figure 14 : Cinétiques du pourcentage de surface foliaire tavelée sur 3 variétés de pommiers inoculées avec des suspensions d'ascospores de *Venturia inaequalis* issues des litières foliaires inoculées par les modalités EAU et PYR à l'automne 2022 pour différents sites. A = GALA ; B = GOLDEN DELICIOUS ; C = JUDELINE. Ns indique qu'aucune différence significative est observée entre les modalités EAU et PYR sur un site. Les lettres a et b indiquent une différence significative entre les modalités EAU et PYR sur un site.

CLS (cystéine lyase) et BIS2 (biphenyl synthase). Seul AGG différencie nettement les 2 traitements, fortement induit par le Bion alors qu'il est peu modulé par PYR.

Ces deux graphiques 15 et 16 nous apportent des informations importantes, avec beaucoup de variables (29 gènes). Cependant, nous comparons nos échantillons d'intérêts avec un seul SDP, le Bion, qui est un fort stimulateur des défenses du pommier. Afin de compléter notre analyse, l'équipe Respom de l'IRHS de Beaucouzé nous a fourni un jeu de données (données qPFD), où plusieurs produits ont été criblés et où 2 SDP de référence moins puissants que le Bion ont été intégrés : le Soriale (phosphanate de potassium) et le Limocide (huile essentielle d'orange douce). Nous avons effectué une ACP (analyse en composantes principales) de ces données (indiquées Respom) combinés aux nôtres (indiquées ENFIN), en utilisant les expressions des gènes comme variables et les échantillons comme individus. L'ACP nous permet de simplifier le nombre important de variables en composantes principales, afin de tirer les informations les plus importantes de notre jeu de données.

La figure 18 est un plot représentant le pourcentage des variances expliquées en fonction des dimensions. Nous voyons que 51% des variations contenues dans le jeu de données sont expliquées par les 1ères et 2èmes composantes principales (37,82% et 13,32% respectivement). La figure 17 représente la contribution des variables (toutes à coordonnées positives) sur les composantes principales. Nous pouvons voir que certaines PR protéines, AGG, BIS2, CLS et la voie de l'acide salicylique contribuent le plus sur la dimension 1, alors que certains gènes de la voie des phénylpropanoïdes et la voie de l'acide jasmonique contribuent à la dimension 2.

A partir de cette ACP, nous avons pu récupérer les coordonnées de chaque échantillon sur ces deux dimensions. Le graphique 19 représente la projection de l'ensemble des individus (échantillon Respom et moyennes des coordonnées de nos échantillons ENFIN des 2 expérimentations) sur ce plan principal, et permet de repérer les traitements provoquant des modulations similaires de gènes et de positionner les traitements par rapport au témoin EAU. L'effet des traitements s'observe surtout sur la dimension 1, vu la faible variance expliquée par la dimension 2. La projection des individus sur l'axe 1 montre que les individus Bion, que ce soit Respom ou ENFIN se trouvent les plus éloignés du témoin EAU. Vient ensuite l'échantillon PYR 1,5 millions sp/ml et le Limocide qui ont quasiment la même coordonnée sur la dimension 1. Enfin, l'échantillon PYR à 400 000 sp/ml est proche du Soriale. Nous pouvons dire que la souche PYR à 1,5 millions sp/ml stimule autant les défenses que le Soriale et le Limocide. Enfin, la souche PYR à 400 000 sp/ml est proche du Soriale, mais semble stimuler un peu moins

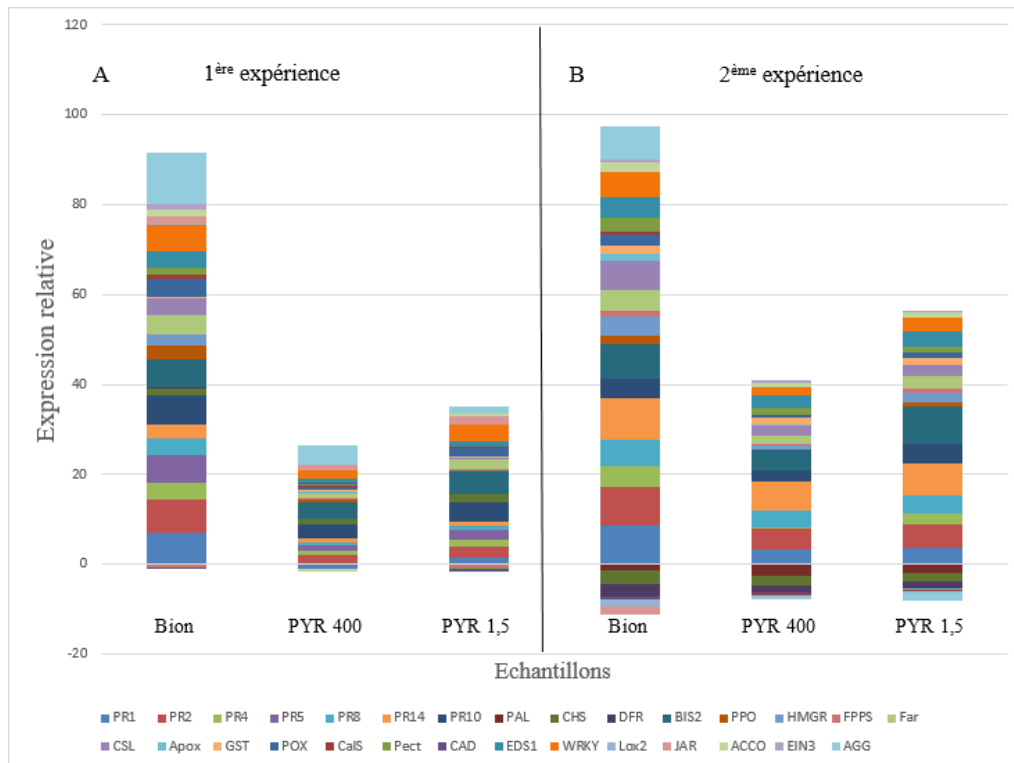


Figure 15 : Expression relative des 29 gènes de défense (cumulés) des différents échantillons 3 jours après inoculation de PYR (*Venturia inaequalis* f.sp *pyracanthae*) et du Bion comparé au témoin eau. A= 1<sup>ère</sup> expérimentation ; B = 2<sup>ème</sup> expérimentation ; 400 = 400 000sp/ml ; 1,5 = 1,5 millions sp/ml

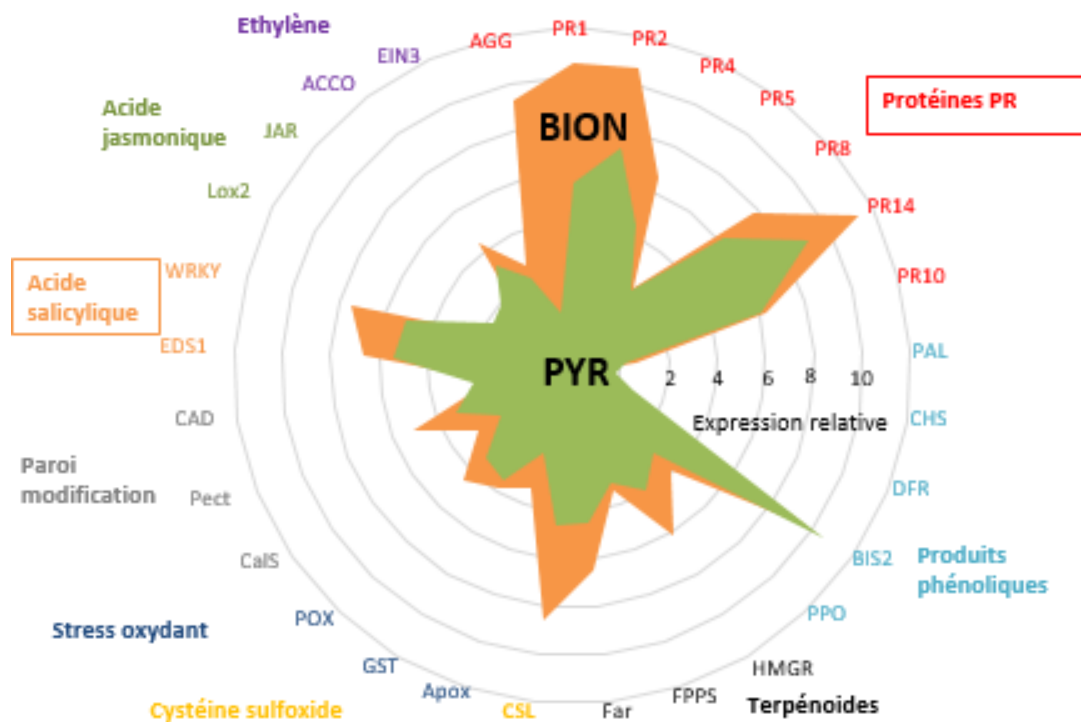


Figure 16 : Expression relative des gènes de défense induits par la souche PYR (*Venturia inaequalis* f.sp *pyracanthae* (1,5 millions spores/ml) et par le Bion comparé au témoin eau (2<sup>ème</sup> expérience)

les défenses que ce SDP.

## **B – Test d’efficacité (invention 2)**

Les plants de pyracantha que nous avons utilisés comme témoin pour les infections de PYR ont présenté des symptômes de tavelure, ce qui nous permet de vérifier que les traitements PYR se sont déroulés dans de bonnes conditions.

La figure 20-A représente le pourcentage de surface foliaire tavelée sur la variété « Gala » en fonction des jours post inoculation (DPI) d’un inoculum de conidies en vrac, précédé de deux traitements de chacune des modalités EAU, PYR, ou Bion. A 24 DPI, le pourcentage de tavelure sur les feuilles prétraitées avec l’eau est de 19,7%, 0.2% pour les feuilles prétraitées avec du Bion, et 20% pour les feuilles prétraitées avec PYR. Le Bion entraîne une réduction significative de la maladie, mais nous n’observons pas de différence significative entre les modalités PYR et EAU sur le pourcentage de surface foliaire tavelée de la variété « Gala » à 24 DPI, ni sur l’AUDPC.

La figure 20-B représente le pourcentage de surface foliaire tavelée sur la variété « Golden Delicious » en fonction des jours post inoculation d’un inoculum de conidies en vrac, précédé de deux traitements de chacune des modalités EAU, PYR, ou Bion. A 23 DPI, le pourcentage de tavelure sur les feuilles prétraitées avec l’eau est de 49,9%, 12.6% pour les feuilles prétraitées avec du Bion, et 38,8% pour les feuilles prétraitées avec PYR. Nous observons à nouveau un effet significatif du Bion et nous notons également une différence significative entre les modalités PYR et EAU sur le pourcentage de surface foliaire tavelée de la variété « Golden Delicious » à 23 DPI, ainsi que sur l’AUDPC. Suite au traitement PYR, une diminution de 22 % de surface foliaire tavelée est observée comparé au traitement EAU.

La figure 20-C montre le pourcentage de surface foliaire tavelée sur la variété « Judeline » en fonction des jours post inoculations d’un inoculum de conidie en vrac, précédé de deux traitements de chacune des modalités EAU, PYR et Bion. A 23 DPI, le pourcentage de tavelure sur les feuilles prétraitées avec de l’eau est de 14,3%, 9,6% pour les feuilles prétraitées avec PYR, et 2,5% pour celles prétraitées avec du Bion. Aucune différence significative n’a été observé entre les modalités EAU et PYR sur le pourcentage de surface foliaire tavelée à 23DPI, ainsi que sur l’AUDPC. Cette expérience a également été effectuée avec un inoculum ascospore en vrac sur les variétés « Golden Delicious » et « Gala » (Annexe IV et V). Sur les variétés « Gala » et « Golden Delicious », aucune différence significative n’a été observée entre les modalités PYR et EAU sur le pourcentage de surface foliaire tavelée.

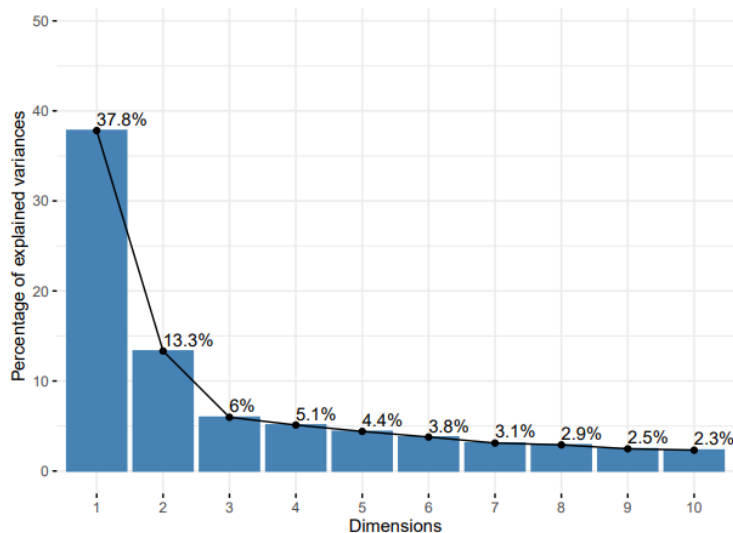


Figure 18 : Plot représentant le pourcentage des variances expliquées en fonction des dimensions

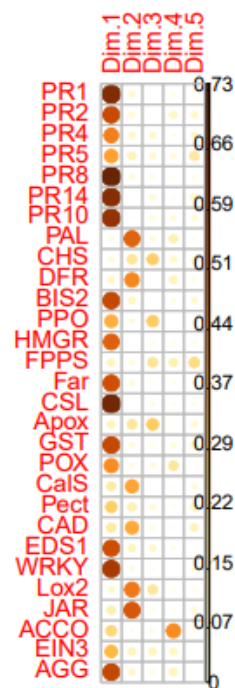


Figure 17 : Contribution des variables sur les composantes principales

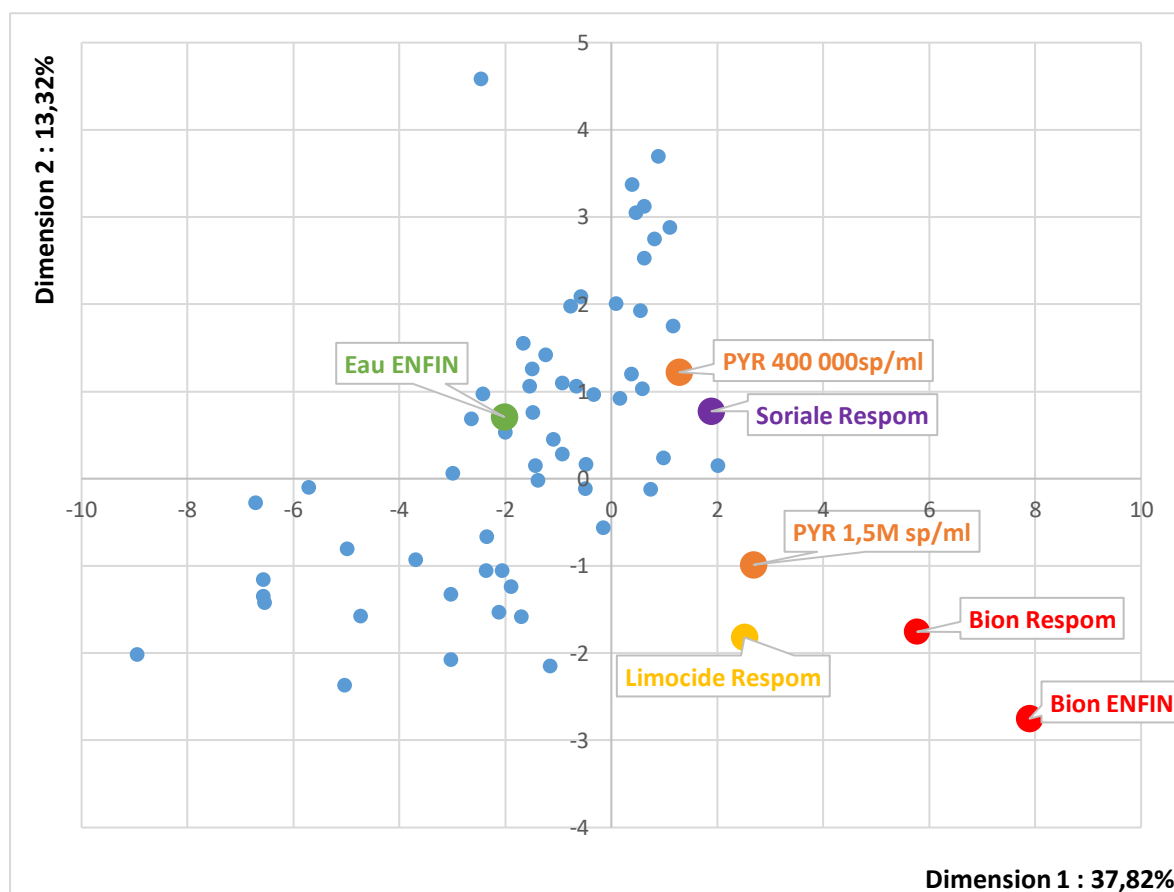


Figure 19 : Coordonnées de chaque échantillon sur les deux composantes principales de l'ACP. Données fournies par Respom sur des produits criblés pour leur effet de stimulation des défenses (en bleu) et 3 stimulateurs de référence (Bion Respom, Limocide Respom et Soriale Respom). Données obtenues au cours de ce stage indiquées ENFIN pour les modalités PYR (à 1,5 millions sp/ml et 400 000 sp/ml), Bion et Eau (moyenne des coordonnées des 2 expériences)



# DISCUSSION

## I – Invention 1 : Détournement sexuel

### A – Analyse des litières foliaires par PCR

Au vu des résultats, il semblerait que la colonisation de PYR sur les litières foliaires s'est faite uniquement sur les sites de Lanxade et Beaucouzé. Les bandes observées sur les gels étant cependant très légères, il sera nécessaire de vérifier ces résultats.

Nous observons également des bandes aspécifiques, témoignant d'un problème de spécificité des amorces utilisées. La spécificité des amorces avait été validée en effectuant des PCR sur des ADN de souches PYR et POMI monoconidiennes de collection. Or ici, nous travaillons avec des litières foliaires ayant subi une incubation hivernale extérieure, où la diversité des souches fongiques présentes est donc importante.

Lors du design des amorces par l'équipe EcoFun, l'alignement des séquences n'a pas dû prendre en compte une assez grande diversité de souches PYR et POMI. L'outil PCR mis à ma disposition pour ce stage reste donc à améliorer, ainsi que la mise au point d'un outil de qPCR qui permettrait de quantifier la colonisation de PYR.

### B – Test d'efficacité (invention 1)

Suite aux inoculations des souches PYR à l'automne 2022 sur les feuilles de pommier des différents vergers, nous avons comme hypothèse que les souches POMI déjà présentes peuvent se croiser avec les souches PYR et ainsi produire des hybrides non pathogènes sur pommier au printemps suivant. C'est pourquoi, nous nous attendions à observer une baisse de symptômes sur les variétés de pommier suite aux inoculations d'ascospores provenant des feuilles prétraitées avec PYR. Les résultats de cette analyse nous ont démontré qu'une différence significative se manifeste entre les modalités PYR et EAU sur la sévérité des symptômes des variétés « Golden Delicious » et « Gala », seulement pour les inocula du site de Lanxade.

Tout d'abord, il est important de rappeler que lors des applications de PYR à l'automne 2022, le pourcentage de pousses tavelées était variable entre les sites. Effectivement, le pourcentage de pousses tavelées pour les sites de La Morinière et de Sées (variété « Petit Jaune ») était de 17% et 60% respectivement (contre minimum 90% pour les autres sites). Ceci explique pourquoi nous avons eu des difficultés à obtenir suffisamment d'ascospores pour ces sites

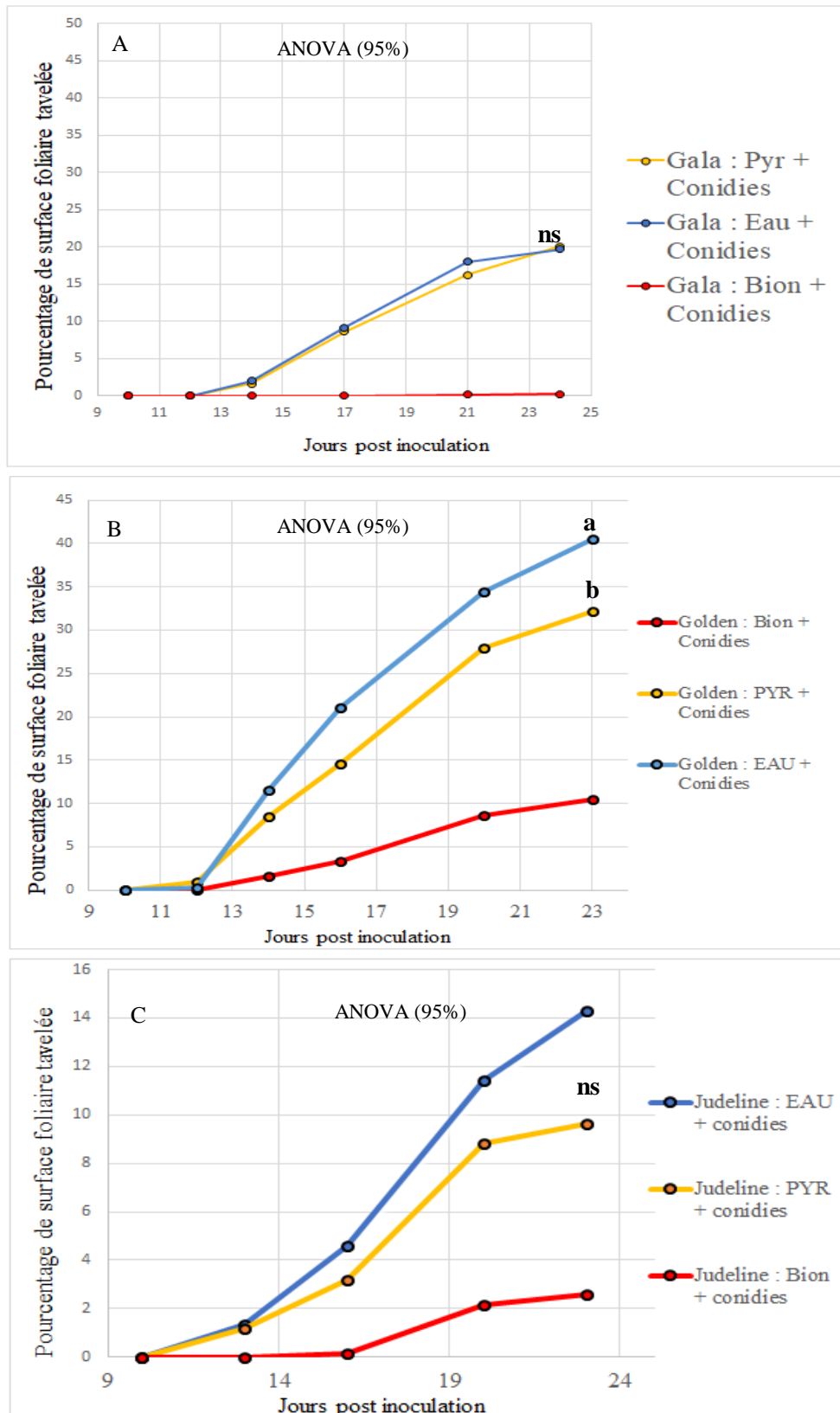


Figure 20 : Cinétiques du pourcentage de surface foliaire tavelée sur 3 variétés de pommiers inoculées avec des suspensions de *Venturia inaequalis* en vrac (conidie), précédé de deux traitements EAU, PYR ou Bion.. A = GALA ; B = GOLDEN DELICIOUS ; C = JUDELINE. Ns indique qu'aucune différence significative n'est observée entre les modalités EAU et PYR. Les lettres a et b indiquent qu'une différence significative est observée entre les modalités EAU et PYR

(Tableau 3). Ainsi, un maximum de 4% de tavelure a été observé suite à l'inoculation des ascospores du site de La Morinière dont la concentration était faible (2000 à 3000 sp/ml). L'analyse des résultats pour ce site est donc difficilement interprétable. La même difficulté s'est manifestée pour le site de Sées (variété « Petit Jaune »), où nous avons décidé de ne pas faire le test d'efficacité à cause du manque d'ascospores. (Gadoury 1986) ont démontré que le nombre de lésions de tavelure par mètre carré de tissu foliaire à la chute des feuilles est le principal déterminant de la dose potentielle d'ascospores au moment de l'infection primaire. Effectivement, plus l'infection est importante à l'automne, plus la production d'ascospores au printemps suivant sera élevée.

Nous avons rencontré une autre complication qui est la récupération des ascospores. Pour le site de Lanxade, une bonne incidence de tavelure à l'automne 2022 avait été observée (92%). Cependant, un maximum de 19 000 sp/ml a été récupéré pour le test d'efficacité. Etant donné que la quantité de tavelure initiale était importante, c'est potentiellement la formation et/ou la maturation des pseudothèces qui est en cause. Lors des envois des feuilles, le stock de pseudothèce matures devait être trop faible, ce qui a fortement limité la récupération des ascospores. Ce constat est identique pour les ascospores provenant du site de Sées (variété « Judeline »), où un maximum de 14 000 sp/ml a été récupéré, alors que l'incidence de la maladie sur ce site à l'automne 2022 était de 98%. Nous savons que plusieurs paramètres peuvent influencer la reproduction sexuée de *Vi*. Notamment la température ; plus elle est élevée, moins il y a formation de pseudothèces (Gadoury 1982). Et cet hiver 2022 a été marqué par des températures hautes, sur les 4 sites.

Si les pseudothèces se sont bien formés avant l'envoi des feuilles, c'est sans doute la maturation de ces derniers qui n'était pas assez avancée. Nous savons que la maturation des pseudothèces (pourcentage d'asques contenant des ascospores matures) augmente de manière constante dans une gamme de température allant de 4 °C à 19/20°C (optimal), puis diminue drastiquement à plus haute température (>21°C) (Wilson 1928). Il serait intéressant au moment de la récupération des feuilles en provenance des sites, de les placer à 20°C afin de prolonger la maturation des pseudothèces et ainsi faciliter la récupération des ascospores.

D'autre part, (Ehlert et al., 2017) ont démontrés qu'une illumination artificielle (radiation infrarouge) peut stimuler la décharge d'ascospores de *Vi*. En effet, la libération d'ascospores chez *Vi* peut être induite par la lumière infrarouge dans la gamme de 1000 à 2000 nm avec des intensités supérieures à 6  $\mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$ .



Ce paramètre pourrait être testé dans les cellules climatisées (équipées de LED) de l'UEH. Concernant nos résultats, il semblerait que l'installation de PYR de façon saprophytique sur les feuilles de pommier et la reproduction sexuée entre les souches POMI et PYR se soient uniquement opérées dans le verger de Lanxade, ce qui aurait entraîné une réduction des symptômes de tavelure. Bien sûr, il faudra répéter ces expérimentations plusieurs fois afin d'avoir une représentation robuste des résultats. De plus, les lots 1 et 3 des litières foliaires seront eux aussi à intégrer dans des tests d'efficacité.

## II – Invention 2 : Effet protecteur des souches PYR

### A – Capacité à induire les défenses du pommier

Nous avons vu que deux applications successives de souches PYR à 4 jours d'intervalle sur des semis de variété « Golden Delicious » entraînent une sur-expression de certains gènes de défenses. Une concentration forte de 1,5 millions sp/ml s'avère plus efficace qu'une concentration de 400 000 sp/ml pour stimuler les défenses.

La voie de l'acide salicylique (EDS1, WRKY) ainsi que les protéines PR (1, 2, 4, 8, 14,10) étaient les plus sur-exprimées suite à l'inoculation. Des résultats similaires ont été observés chez d'autres pathosystèmes : les PR-10 sont rapidement accumulées après application d'une souche de *Cochliobolus heterostrophus* non pathogène sur le sorgho (Lo et al., 1999) ou après inoculation d'une souche de *Fusarium solani f.sp phaseoli* non pathogène sur le pois (Fristensky et al. 1985). Cependant, il a également été démontré que les PR10 pouvaient aussi être sur-exprimées dans le cas d'interactions compatibles (Fristensky et al. 1985), y compris dans le cas de la tavelure du pommier où deux sous classes de gènes PR-10 étaient spécifiquement activées après inoculation d'une souche Vi virulente sur « Golden Delicious » (Chevalier et al. 2008).

Ces résultats contradictoires nous renseignent sur la diversité et la complexité des réponses moléculaires (Thordal-Christensen 2003).

Des imageries de microscopie confocales (données EcoFun non publiées) nous ont indiqué que la souche PYR arrive tout de même à germer et à former un appressorium sur les feuilles de pommier. Ce serait alors par la reconnaissance du non soi (PAMPs) par le pommier, que ce dernier initierait des cascades de réactions moléculaires à l'origine de la sur expression des gènes de la voie du SA et des protéines PR, qui pourrait entraîner l'arrêt précoce du développement du champignon. En effet certaines protéines PR possèdent des activités antifongiques (activités enzymatiques hydrolysantes de la paroi ou autre). Comme c'est le cas



des PR-2 ( $\beta$  1-3 glucanases), PR-4, -8 (chitinases), PR-14 (protéines de transferts de lipides) mais leur effet sur *Vi* reste à démontrer. Nous notons également une très forte expression de BIS2 suite aux inoculations des souches PYR sur les semis de « Golden Delicious ». La biphenyl synthase est une enzyme à l'origine de la formation de l biphényl, une phytoalexine (Sarkate et al., 2019). Une accumulation de biphenyl a été observée chez la variété de pommier « Florina » résistante à la tavelure (gène majeur de résistance Rvi6) inoculé par une souche avirulente de *Vi* (Sarkate et al., 2018).

On sait de plus que le biphenyl possède des propriétés antifongiques (Chizzali et Ludger Beerhues 2012). Nous pouvons formuler l'hypothèse que cette phytoalexine serait impliquée dans l'inhibition du développement du champignon.

En s'intéressant aux coordonnées de nos échantillons sur les deux composantes principales de l'ACP, nous voyons que l'application d'une souche PYR à 400 000 sp/ml se rapproche d'une application de Soriale et que l'application d'une souche PYR à 1,5 millions sp/ml se rapproche du Limocide en termes de stimulateur des gènes de défense du pommier. Il a été démontré (Gaucher et al., 2022), que le Soriale est un inducteur des voies de défense du pommier, en stimulant la production de PR-protéine (PR-8) ou encore de BIS2. Au vu de nos résultats, la souche PYR semble être un bon candidat pour stimuler les gènes de défense du pommier, et pourrait donc être intégrée dans une stratégie de lutte biologique contre la tavelure. Cependant, une concentration de 1,5 millions de sp/ml reste conséquente à appliquer en verger. Il serait intéressant de réaliser d'autres tests qPFD, pour déterminer si la stimulation des défenses du pommier varie en fonction des souches PYR, et d'identifier les souches PYR les plus efficaces en tant que SDP. Il serait également intéressant de tester une gamme de concentrations pour potentiellement identifier un « plateau » où une augmentation de concentration n'augmenterait plus l'expression des gènes, et identifier ainsi la concentration minimale nécessaire permettant une bonne stimulation des défenses. Une gamme prenant en compte les concentrations 400 000, 600 000, 800 000, 1 000 000 et 1,5 millions sp/ml serait pertinente.





## **B – Test d’efficacité (invention 2)**

Les résultats du test d’efficacité de l’invention 2, nous témoignent d’un effet protecteur de PYR, sur la sévérité des symptômes de tavelure sur la variété de pommier « Golden Delicious » avec comme inoculum des conidies. Ce constat n’est pas observable sur les autres variétés de pommier (« Judeline » et « Gala »), et avec les inocula ascospores. Des résultats précédemment trouvés en 2022 (données EcoFun non publiées), démontraient également un effet protecteur de PYR uniquement sur la variété « Golden Delicious », et que cet effet protecteur dépendait de l’inoculum utilisé (efficacité avec la souche POMI 2565 et inefficacité avec la souche POMI 104). Nous avons pour nos expérimentations des inocula en vrac contenant une diversité de souches POMI, et un effet protecteur PYR a été observé seulement avec l’inoculum conidies. Compte tenu d’un effet souche POMI (résultats 2022), les différences de résultats observés entre l’inoculum conidies et l’inoculum ascospores peuvent probablement s’expliquer par une variabilité des souches POMI au sein des inocula en vrac, plutôt que par une différence entre conidies et ascospores. De plus, un effet de la variété est observé ; l’effet protecteur de PYR n’a pas été observé sur les variétés « Judeline » et « Gala ». Il serait intéressant d’effectuer des analyses qPFD pour comparer les variétés de pommiers (« Gala », « Petit Jaune », « Judeline » et « Golden Delicious »), afin d’identifier ou non une différence inter variétale dans les réactions de défense suite à une inoculation de PYR.



## CONCLUSION

Durant ce stage, l'efficacité de deux inventions brevetées du projet ENFIN ! de l'équipe EcoFun a été évaluée. La première invention 1 repose sur le détournement sexuel de *V. inaequalis*, qui apporterait une protection sur pommier par la projection au printemps des ascospores non pathogènes issues de croisements PYR x POMI générées suite à l'application de souches PYR à l'automne. L'invention 2 repose sur une protection induite sur pommier, suite à l'application de souches PYR au printemps et en été.

Concernant l'invention 1 : le déploiement de cette invention en verger de production est trop précoce au vu des résultats. Effectivement, les résultats PCR nous indiquent que la colonisation de PYR se serait effectuée seulement sur les sites de Beaucouzé et Lanxade, et les tests d'efficacité semblent montrer que des croisements POMI x PYR se seraient effectués seulement sur le site de Lanxade. Des répétitions techniques sont indispensables afin d'apporter une conclusion robuste. Il reste quelques optimisations à réaliser. Tout d'abord, des techniques et protocoles restent à améliorer concernant la récupération des ascospores à partir des litières foliaires et concernant la détection de PYR. Ensuite, il sera nécessaire d'optimiser l'efficacité des traitements PYR à l'automne en prenant en compte tous les paramètres pouvant influencer la colonisation saprophytique de PYR sur feuilles sénescentes de pommier et la reproduction sexuée de *V. inaequalis* entre souches PYR et POMI.

Concernant l'invention 2 : la souche PYR monoconidienne 1381 semble être un bon candidat pour stimuler les gènes de défense de la variété de pommier « Golden Delicious », et ainsi être intégrée dans une stratégie de lutte contre la tavelure du pommier en vergers. Effectivement, des inoculations de PYR sur semis de « Golden Delicious » sont comparables à des inoculations de deux SDP Soriale ou de Limocide en termes de stimulation des voies de défense. Cependant, réaliser deux applications de 1,5 millions de spores/ml pour protéger chaque risque d'infection reste considérable, et difficilement réalisable en verger. D'autres expérimentations sont nécessaires, en criblant plusieurs souches PYR à des concentrations différentes allant de 400 000 à 1,5 millions de spores/ml, et en testant si une seule application de PYR serait suffisante. De plus, les tests d'efficacité montrent une variabilité selon la variété de pommier et selon l'inoculum POMI. Il faudra donc lever ces limites avant de pouvoir utiliser cette invention de façon efficace au verger.



# BIBLIOGRAPHIE

- Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology*. San Diego, CA : Elsevier
- Ashby A.M. (2000). « Biotrophy and the Cytokinin Conundrum ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57 (4): 147-58.
- 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». *Molecular Plant Pathology* 12(2), 105-122
- Bus V.G.M, Rikkerink E.H.A, Caffier V, Durel C.E, et Plummer K.M. (2011). « Revision of the Nomenclature of the Differential Host-Pathogen Interactions of *Venturia Inaequalis* and *Malus* ». *Annual Review of Phytopathology* 49 (1): 391-413.
- Caffier V, Shiller J, Bellanger M.N, Collemare J, Expert P, Gladieux P, Pascouau C, Sannier M, Le Cam B. (2022). *Phytopathology* 112(7), 1401-1405.
- Carisse O, Phillon V, Rolland D, et Bernier J. (2000). « Effect of Fall Application of Fungal Antagonists on Spring Ascospore Production of the Apple Scab Pathogen, *Venturia Inaequalis* ». *Phytopathology* 90 (1): 31-37.
- Chapman, Kimberly S., Sundin G.W, et Beckerman J.L. (2011). « Identification of Resistance to Multiple Fungicides in Field Populations of *Venturia Inaequalis* ». *Plant Disease* 95 (8): 921-26.
- Chevalier M, Parisi L, Gueye B, Campion C, Simoneau P, et Poupard P. (2008). « Specific Activation of PR-10 Pathogenesis-Related Genes in Apple by an Incompatible Race of *Venturia Inaequalis* ». *Biologia Plantarum* 52 (4): 718-22.
- Chizzali C, et Beerhues L. (2012). « Phytoalexins of the Pyrinae: Biphenyls and Dibenzofurans ». *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8 (avril): 613-20.
- Cordero-Limon L, Shaw M.W, Passey T.A, Robinson J.D, et Xu X. (2021). « Cross-resistance between Myclobutanil and Tebuconazole and the Genetic Basis of Tebuconazole Resistance in *Venturia Inaequalis* ». *Pest Management Science* 77 (2): 844-50.
- Ehlert K, Piepenbring M, Kollar A. (2017). « Ascospore release in apple scab underlies infrared sensation ». *Fungal Biology* 121(12) : 1054-1062
- Gaucher M, Heintz C, Cournol R, Juillard A, Bellevaux C, Cavaignac S, Coureau C, Giraud M, Le Maguet J, Bérud M, Koké E, Crété X, Lemarquand A, Orain G et Brisset M.N (2022). « The Use of Potassium Phosphoante (KHP) for the Control of Major Apple Pests ». *Plant Disease* 106: 3166-3177.
- Gadoury D.M. (1986). « Forecasting Ascospore Dose of *Venturia inaequalis* in Commercial Apple Orchards ». *Phytopathology* 76 (1): 112.
- Gladieux P, Zhang X.G, Róldan-Ruiz I, Caffier V, Leroy T, Devaux M, Van Glabeke S, Coart E, et Le Cam B. (2010). « Evolution of the Population Structure of *Venturia Inaequalis* , the Apple Scab Fungus, Associated with the Domestication of Its Host». *Molecular Ecology* 19 (4): 658-74.
- Gusberti M, Gessler C, et Broggin G.A.L. (2013). « RNA-Seq Analysis Reveals Candidate Genes for Ontogenic Resistance in *Malus-Venturia* Pathosystem ». *PLoS ONE* 8 (11): e78457.
- Jha G, Thakur K, et Thakur P. (2009). « The *Venturia* Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009: 1-10.
- Keitt G.W. (1952). « Inheritance of Pathogenicity in *Venturia Inaequalis* (Cke.) Wint. ». *The American Naturalist* 86 (831): 373-90.
- Kollar A. (1998). « Characterization of an Endopolygalacturonase Produced by the Apple Scab Fungus, *Venturia Inaequalis* ». *Mycological Research* 102 (3): 313-19.
- Köller W, Parker D.M, Becker C.M. (1991). « Role of cutinase in the Penetration of Apple Leaves by *Venturia inaequalis* ». *Phytopathology* 81 :1375-1379.
- Lahlali R, Ezrari S, Radouane N, Kenfaoui J, Esmaeel Q, El Hamss H, Belabess Z, et Ait Barka E. (2022). « Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective ». *Microorganisms* 10 (3): 596.
- Le Cam B, Parisi L, Arene L. (2002). “Evidence of Two Formae Speciales in *Venturia inaequalis*? Responsible for Apple and *Pyrnantha* Scab”. *Phytopathology* 92:314-320.
- Lo S.C.C, Hipskind J.D, et Nicholson R.L. (1999). « CDNA Cloning of a Sorghum Pathogenesis-



- Related Protein (PR-10) and Differential Expression of Defense-Related Genes Following Inoculation with *Cochliobolus Heterostrophus* or *Colletotrichum Sublineolum* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (6): 479-89.
- MacHardy W.E, Gadoury D.M, et Gessler C. (2001). « Parasitic and Biological Fitness of *Venturia Inaequalis* : Relationship to Disease Management Strategies ». *Plant Disease* 85 (10): 1036-51.
- Marolleau B, Gaucher M, Heintz C, Degrave A, Warneys R, Orain G, Lemarquand A, Brisset M.N. (2017). « When a Plant Resistance Inducer Leaves the Lab for the Field :Integrating ASM into Routine Apple Protection Plant ». *Front. Plant Sci.* 8:1938.
- McDonald B.A, et Linde C. (2002). « Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential and Durable Resistance». *Annual Review of Phytopathology* 40 (1): 349-79.
- Padmathilake K.R.E et Fernando W.G.D. (2022). «Less Virulent *Leptosphaeria biglobosa* Immunizes the Canola Plant to Resist Highly Virulent *L. maculans*, the Blackleg Pathogen». *Plant* 11, 996
- Parveaud C.E, Gomez C, Gros C, et Asencio P. (2014). « Is Leaf Litter Removal More Efficient than Leaf Litter Shredding to Control Apple Scab? An Answer in a Commercial Organic Orchard ». *Plant Disease* 104 (8): 2074-81..
- Patocchi A , Wehrli A, Dubuis P.H, Auwerkerken A, Leida C, Cipriani G, et Passey T. (2020). « Ten Years of VINQUEST: First Insight for Breeding New Apple Cultivars With Durable Apple Scab Resistance ». *Plant Disease* 104 (8): 2074-81..
- Phillon V, Joubert V, Trapman M, Hjelkrem A.G.R, et Stensvand A. (2020). « Distribution of the Infection Time of Ascospores of *Venturia Inaequalis* ». *Plant Disease* 104 (2): 465-73.
- Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, et Balesdent M.H. (2003) « A 10-Year Survey of Populations of *Leptosphaeria Maculans* in France Indicates a Rapid Adaptation towards the Rlm1 Resistance Gene of Oilseed Rape ». *European Journal of Plant Pathology* 109 (8) : 871-881
- Sarkate A, Saini S.S, Gaid M, Teotia D, Mir J.I, Agrawal P.K, Beerhues L, et Sircar D. (2019). « Molecular Cloning and Functional Analysis of a Biphenyl Phytoalexin-Specific O-Methyltransferase from Apple Cell Suspension Cultures ». *Planta* 249 (3): 677-91.
- Smereka K.J, Machardy W.E, et Kausch A.P. (1987). « Cellular Differentiation in *Venturia Inaequalis* Ascospores during Germination and Penetration of Apple Leaves ». *Canadian Journal of Botany* 65 (12): 2549-61.
- Thordal-Christensen H. (2003). « Fresh Insights into Processes of Nonhost Resistance ». *Current Opinion in Plant Biology* 6 (4): 351-57.
- Valsangiacomo C, et Gessler C. (1992). « Purification and Characterization of an Exo-Polygalacturonase Produced by *Venturia Inaequalis*, the Causal Agent of Apple Scab ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40 (1): 63-77.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman, (2002). « Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes ». *Genome Biology* 3, research0034.1.
- Walters D.R, et McRoberts N. (2006). « Plants and Biotrophs: A Pivotal Role for Cytokinins? » *Trends in Plant Science* 11 (12): 581-86.
- Warneys R, Matthieu G, Philippe R, Sophie A, Anton S, Aubourg S, Barthes N, et al. (2018). « Acibenzolar-S-Methyl Reprograms Apple Transcriptome Toward Resistance to Rosy Apple Aphid ». *Frontiers in Plant Science* 9 : 1795.
- Wilson E.E. (1928). « Studies of the ascigerous stage of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. in relation to certain factors of the environment. *Phytopathology* 18 :375-417.
- Xu X. M, Robinson J. (2005). « Modelling the Effects of Wetness Duration and Fruit Maturity on Infection of Apple Fruits of Cox's Orange Pippin and Two Clones of Gala by *Venturia Inaequalis* ». *Plant Pathology* 54 (3): 347-56.
- Young C.S, Andrews J.H. (1990). « Inhibition of pseudothecial development of *Venturia inaequalis* by the basidiomycete *Athelia bombacina* in apple leaf litter ». *Phytopathology* 80 :536-542.
- AGRESTE (2023). En 2023, une production de pommes en hausse de 9%. <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/IraFru2387/detail/>


FranceAgriMer (2021) : Les chiffres-clés de la filière Fruits & Légumes frais et transformés en 2021

<https://www.franceagrimer.fr/filiere-fruit-et-legumes/Eclairer/Etudes-et-Analyses/Chiffres-et-bilans>





# ANNEXES

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

Ref: 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 incubé 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 incubé 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'élution (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)

*Annexe I : Protocole d'extraction d'ARN (kit NucleoSpin RNA Plant)*

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

# 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)

## 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 2/2

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	ou qsp 19 µl :	12,8 µl d'eau ultrapure
	8 µl de buffer Taq (5X)		4 µl de buffer Taq (5X)
	2,4 µl de MgCl <sub>2</sub> 25 mM		1,2 µl de MgCl <sub>2</sub> 25 mM
	1 µl de dNTP (2,5 mM chacun)		0,5 µl de dNTP
	0,5 µl de l'amorce directe (10 µM)		0,25 µl de l'amorce directe
	0,5 µl de l'amorce reverse (10 µM)		0,25 µl de l'amorce reverse
	0,1 µl de Taq (GoTaq Flexi Promega)		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 10<sup>7</sup> et 10<sup>8</sup> (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.

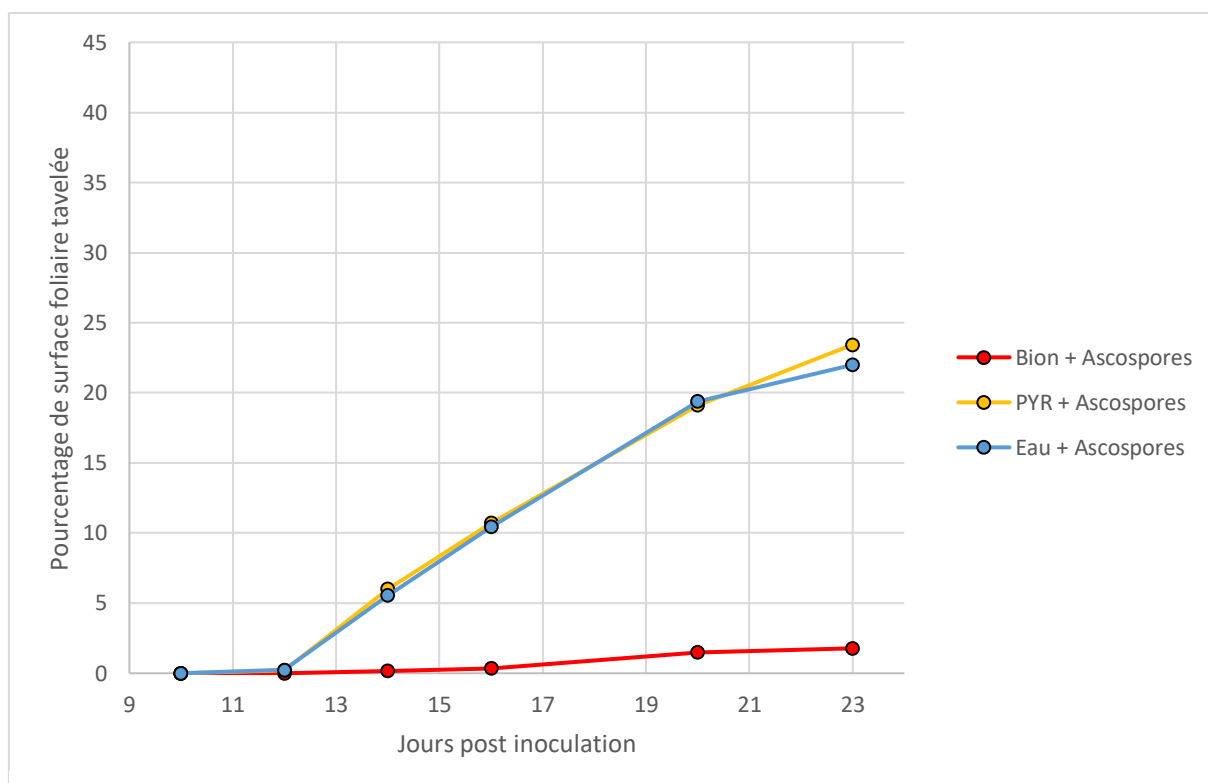
- 2) Lancer la PCR avec le programme type suivant :

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	

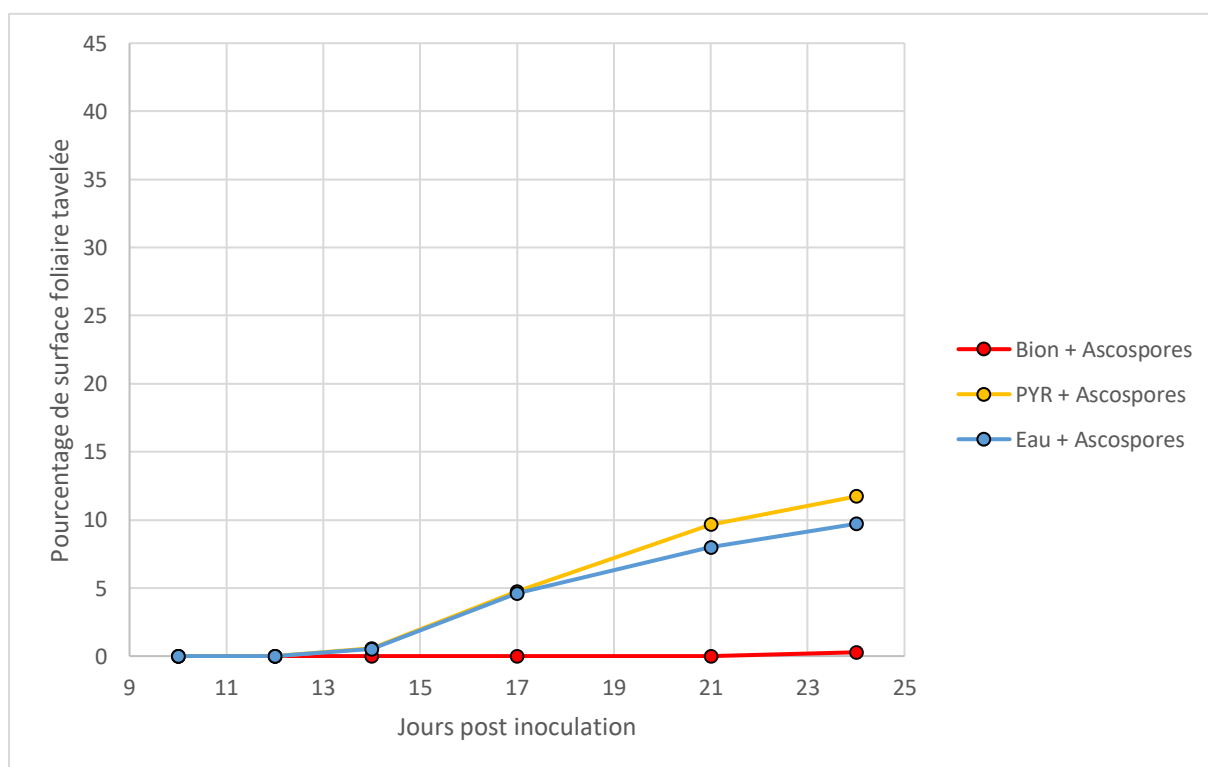
NB : T° optimales d'hybridation des amorces EF : 53°C (ne pas dépasser 55°C) ; des amorces Sp6 ou T7 : 56°C

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

### Annexe III : Suite protocole de Transcription inverse et PCR de vérification



Annexe IV : Cinétiques de surface foliaire tavelée sur variété Golden Delicious suite à une inoculation d'ascospores POMI en vrac, précédé de deux traitements Bion, EAU ou PYR (*Venturia inaequalis* f.sp. pyracanthae)



Annexe V: Cinétiques de surface foliaire tavelée sur variété Gala suite à une inoculation d'ascospores POMI en vrac, précédé de deux traitements Bion, EAU ou PYR (*Venturia inaequalis* f.sp. pyracanthae)



Auteur(s) : Normand Pierre

Date de naissance\* : 17/11/1999

Nb pages : 31

Annexe(s) : 5

Année de soutenance : 2023

Organisme d'accueil : IRHS (Beaucouzé), Equipe EcoFun

Adresse : 42 Rue Georges Morel, 49070 Beaucouzé

Maître de stage : Caffier Valérie

Titre français : Evaluation d'une nouvelle stratégie de bio contrôle appliquée à la tavelure du pommier

Titre anglais : Evaluation of a new bio-control strategy applied to apple scab

Deux inventions visant à développer une nouvelle stratégie de lutte appliquée à la tavelure du pommier, ont été évaluées durant ce stage. L'invention 1 repose sur le détournement sexuel du champignon, et vise sa reproduction sexuée : le but est de le contraindre à se croiser avec des souches PYR (*V. inaequalis f.sp pyracanthae*) pour générer des hybrides non pathogènes sur pommier au printemps. Pour cela, des tests d'efficacité ont été réalisés sur pommier en condition contrôlées avec des ascospores issues des litières foliaires traitées par de l'eau ou PYR à l'automne 2022. Aucune conclusion robuste n'a pu être apportée sur l'efficacité de l'invention 1, des optimisations sont à apporter dans le protocole pour les prochaines expérimentations. L'invention 2 repose sur l'effet protecteur (action de stimulateur des défenses des plantes SDP) de la souche PYR sur le pommier. Des analyses qPFD ont été effectuées, et démontrent un effet stimulateur des voies de défense du pommier suite à une inoculation de souche PYR. La souche PYR monoconidienne 1381 semble être un bon candidat à intégrer dans une stratégie de lutte biologique à la tavelure. En effet les résultats montrent un effet de PYR comparable à des SDP commercialisés.

Two inventions aimed at developing a new control strategy for apple scab were evaluated during this internship. Invention 1 is based on the sexual detour of the fungus, and targets its sexual reproduction: the aim is to force it to cross with PYR strains (*V. inaequalis f.sp pyracanthae*) to generate non-pathogenic hybrids on apple trees in spring. To this end, efficacy tests were carried out on apple trees under controlled conditions with ascospores from leaf litter treated with water or PYR in autumn 2022. No robust conclusion could be drawn on the efficacy of Invention 1, and the protocol needs to be optimized for future experiments. Invention 2 is based on the protective effect (SDP plant defense stimulator action) of the PYR strain on apple trees. qPFD analyses have been carried out, demonstrating a stimulatory effect on apple tree defense pathways following inoculation with PYR strain. The PYR monoconidial strain 1381 appears to be a good candidate for integration into a biological scab control strategy. Indeed, the results show that PYR's effect is comparable to that of commercially available SDPs.

Mots-clés : *Venturia inaequalis*, formes spéciales, pommier, bio-contrôle, détournement sexuel, stimulation des défenses

Key Word : *Venturia inaequalis*, formae speciales, apple, biocontrol, sexuel hijacking, stimulation of defences