

Mémoire de Fin d'Etudes

Master 2 Mention Biologie Végétale (BV)

Parcours Plant Health and Protection (PHP)

2024 – 2025

Développement et optimisation de méthodes moléculaires pour une détection de la flore phytopathogène sur tomate dans le cadre du projet AGRIPOLHYS

Par Philomène DUBOIS



Soutenu à Angers le 09 septembre 2025

Maître de stage : Klervi Crenn

Mémoire de Fin d'Etudes

Master 2 Mention Biologie Végétale (BV)

Parcours Plant Health and Protection (PHP)

2024 – 2025

Développement et optimisation de méthodes moléculaires pour une détection de la flore phytopathogène sur tomate dans le cadre du projet AGRIPOLHYS

Par Philomène DUBOIS



Soutenu à Angers le 09 septembre 2025

Maître de stage : Klervi Crenn

Engagement de non plagiat



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Philomène Dubois _____, déclare être pleinement conscient(e) 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 :

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Philomène Dubois'.

Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

Remerciements

Je tiens à remercier Klervi Crenn, maître de stage et Chargée de projets au sein de l'entreprise Vegenov, pour son encadrement tout au long de mon stage. Son soutien, sa disponibilité et ses conseils m'ont permis de mener à bien mes missions au sein du projet dans lequel s'inscrit mon stage et d'acquérir une expérience très enrichissante.

Je remercie également Claire Campion, ma tutrice académique et Enseignante-chercheuse à l'Université d'Angers, pour son précieux accompagnement tout au long de mon stage. Ses conseils avisés lors de nos échanges sur le suivi de mon avancement et la rédaction du rapport m'ont été d'une grande aide.

Un grand merci aux personnes du plateau de Biologie moléculaire à Vegenov, pour leur supervision au début de mon stage. Ils m'ont accompagnée dans les différentes étapes de biologie moléculaire, en particulier lors de l'extraction d'ADN, de la réalisation de la qPCR et de la prise en main des différents logiciels nécessaires pour l'analyse des résultats.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe de microbiologie pour son accompagnement tout au long du stage. Leur aide précieuse a grandement contribué à la mise en place des essais expérimentaux. Je les remercie aussi pour m'avoir formée aux techniques de microbiologie, notamment l'inoculation sur les feuilles de tomate, la préparation de suspensions calibrées de spores et le repiquage des souches fongiques.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille pour la relecture de ce mémoire de stage. Bien qu'ils ne travaillent pas dans le domaine scientifique, leur aide m'a permis de le rendre plus compréhensible en m'encourageant à clarifier et à détailler certaines parties.

Table des matières

Engagement de non plagiat.....	
Remerciements	
Glossaire.....	
Liste des abréviations	
Liste des annexes.....	
Liste des illustrations	
I. Introduction générale	1
1) Contexte scientifique et enjeux phytosanitaires de la culture de la tomate	1
2) Synthèse de la bibliographie existante.....	3
a) Principaux agents phytopathogènes de la tomate	3
b) Méthodes de détection des agents pathogènes fongiques.....	5
3) Problématique du travail et objectifs du stage	6
II. Matériels et méthodes	8
1) Pathosystèmes étudiés	8
a) Plante hôte : la tomate	8
b) Champignons phytopathogènes étudiés	8
c) Mise en place des bioessais.....	10
2) Analyses moléculaires.....	11
a) Développement des amores moléculaires	11
b) Préparation des échantillons	11
c) Protocoles de qPCR	12
III. Résultats.....	15
1) Analyse des amores moléculaires en simplex	15
a) Résultats <i>in silico</i>	15
b) Résultats expérimentaux : spécificité sur souches cibles et non cibles.....	15
c) Performances analytiques (courbes d'étalonnage, LOD, LOQ).....	16
2) Analyse des amores moléculaires en multiplex	17
a) Résultats <i>in silico</i> et vérification des interactions croisées	17
b) Résultats expérimentaux (spécificité sur souches cibles et non cibles)	17
c) Performances analytiques (courbes d'étalonnage, LOD, LOQ).....	18
3) Essais sur plantes	19
a) Mildiou	19
b) Botrytis.....	19
c) Oïdium	20
d) Cladosporiose	20
IV. Discussion	21
1) Validation expérimentale sur souches fongiques des amores en simplex.....	21
a) Spécificité et performances des amores	21
b) Sélection finale des amores optimales	21
2) Validation expérimentale sur souches fongiques des amores en multiplex.....	22
a) Spécificité et performances des systèmes multiplex	22
b) Optimisation et sélection des combinaisons d'amores pour le multiplexage	22
3) Validation expérimentale sur prélèvements issus des essais sur plantes	23
a) Corrélation entre les symptômes observés et les quantifications moléculaires.....	23
b) Limites et perspectives pour l'application en diagnostic précoce	24
V. Conclusion et perspectives	25
Bibliographie	27
Sitographie	30
Annexes.....	
Résumé	

Glossaire

Amorces moléculaires : Oligonucléotides qui, hybridés avec une matrice d'acide nucléique, permettent à une polymérase de déclencher la synthèse du brin complémentaire.

Bioessai : Expérimentation biologique visant à évaluer la réponse d'un organisme (plante, micro-organisme) à un traitement, un agent pathogène ou un facteur environnemental, en conditions contrôlées.

Biotrophe : Organisme pathogène qui se nourrit exclusivement de tissus vivants de son hôte sans provoquer sa mort immédiate, établissant une relation durable et spécifique avec ce dernier.

Cycle seuil : Nombre de cycles au-delà duquel le signal de fluorescence en qPCR dépasse le seuil prédéfini, marquant la détection de l'ADN cible pendant la phase exponentielle.

Haustorium : Organe spécialisé des plantes ou champignons parasites, l'haustorium pénètre les tissus de l'hôte pour y puiser l'eau et les nutriments nécessaires à sa nutrition.

Hyphes : Filaments tubulaires constituant le mycélium des champignons filamenteux.

Imageur spectro-polarimétrique : Instrument optique permettant d'acquérir simultanément des informations sur la distribution spectrale et l'état de polarisation de la lumière réfléchie ou émise par une scène, offrant ainsi une caractérisation multidimensionnelle des objets observés.

Limite de détection (LOD) : Plus faible quantité d'analyte pouvant être détectée par une méthode analytique, même si la quantification précise n'est pas possible.

Limite de quantification (LOQ) : Plus faible quantité d'analyte pouvant être mesurée avec précision et exactitude par une méthode analytique, selon des critères de performance définis.

Nécrotrophe : Organisme pathogène qui tue les cellules de son hôte avant de se nourrir des tissus morts.

qPCR : Technique de PCR en temps réel permettant de détecter et quantifier spécifiquement un acide nucléique dans un échantillon, en mesurant la fluorescence émise lors de l'amplification.

qPCR multiplex : Méthode de PCR en temps réel permettant la détection simultanée de plusieurs séquences génétiques dans une seule réaction, grâce à l'utilisation de plusieurs paires d'amorces et sondes spécifiques, ce qui permet de gagner du temps et du matériel.

qPCR simplex : Méthode de PCR en temps réel ciblant une seule séquence génétique par réaction. Elle est utilisée pour détecter ou quantifier spécifiquement un seul gène à la fois, garantissant une précision maximale sans interférence.

Sonde TaqMan : Sonde d'hydrolyse utilisée en qPCR, composée d'un oligonucléotide marqué par un fluorophore à l'extrémité 5' et un quenché à l'extrémité 3', permettant la détection spécifique de séquences cibles par émission de fluorescence lors de l'amplification.

Témoin endogène : Gène naturellement présent dans un échantillon, utilisé comme contrôle interne pour valider la qualité de l'extraction et l'absence d'inhibiteurs lors de la PCR quantitative.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGRIPOLHYS : AGRiculture with Intelligent POLarimetric and HYperspectral Sensing

ANR : Agence Nationale de la Recherche

Bc : *Botrytis cinerea*

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn : Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

CBS : Collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

COI : Cytochrome c Oxidase subunit I

c.v. : Cultivar

Cp : Crossing Point (Cycle seuil)

CV : Coefficient de Variation

EESPIG : Établissement d'Enseignement Supérieur Privé d'Intérêt Général

Ff : *Fulvia fulva*

IDT : Integrated DNA Technologies

ITS : Internal Transcribed Spacer

LabISEN : Laboratoire ISEN – Yncréa Ouest

LOD : Limit Of Detection

LOQ : Limit Of Quantification

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NH₄NO₃ : Nitrate d'ammonium

On : *Oidium neolyopersici* (Syn. *Pseudoidium neolyopersici*)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

Pi : *Phytophthora infestans*

PRCE : Projet de Recherche Collaborative Entreprises

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

SYBR Green : SYstems for BRilliant DNA staining

UBI : Ubiquitine

VOCs : Volatile Organic Compounds

Liste des annexes

<u>Annexe I : Protocole détaillé d'extraction d'ADN utilisant le kit MN « Genomic DNA from FOOD » appliqué à différentes matrices biologiques.</u>	I
<u>Annexe II : Spectres d'excitation et d'émission des fluorophores sélectionnés pour le multiplexage qPCR à quatre canaux sur le système LightCycler® 480, pour la détection de <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Fulvia fulva</i> et <i>Pseudoidium neolyopersici</i>.</u>	II
<u>Annexe III : Filtres d'excitation et d'émission disponibles sur le LightCycler® 480 et leurs combinaisons possibles</u>	III

Liste des illustrations

<u>Figure 1 : Symptômes de l'infection par <i>Phytophthora infestans</i> sur la tomate.</u>	3
<u>Figure 2 : Symptômes du champignon phytopathogène <i>Pseudoidium neolycopersici</i> sur feuilles de tomate</u>	3
<u>Figure 3 : Symptômes du champignon phytopathogène <i>Botrytis cinerea</i> sur plants de tomate</u>	4
<u>Figure 4 : Symptômes de l'infection par <i>Fulvia fulva</i> sur plants de tomate.</u>	4
<u>Figure 5 : Plants de tomate de l'essai 5 de la co-inoculation de <i>Pseudoidium neolycopersici</i> et <i>Fulvia fulva</i> en chambre de culture</u>	8
<u>Figure 6 : Schéma du protocole expérimental des bioessais sur tomate selon les pathosystèmes.</u>	10
<u>Figure 7 : Alignement de séquences nucléotidiques du gène Cox1 de souches du genre <i>Phytophthora</i>.</u>	11
<u>Figure 8 : Analyse des températures de fusion des produits amplifiés avec les amores Cox1.1</u>	15
<u>Figure 9 : Analyse des températures de fusion des produits amplifiés avec les amores Bc3.</u>	15
<u>Figure 10 : Analyse des températures de fusion des produits amplifiés avec les amores CfActin</u>	15
<u>Figure 11 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de <i>Phytophthora infestans</i> et le cycle seuil pour les amores INF et Cox1.1</u>	16
<u>Figure 12 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de <i>Pseudoidium neolycopersici</i> et le cycle seuil pour les amores ON et OnTub2.1.</u>	16
<u>Figure 13 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de <i>Botrytis cinerea</i> et le cycle seuil pour l'amorce Bc3.</u>	16
<u>Figure 14 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de <i>Fulvia fulva</i> et le cycle seuil pour l'amorce CfActin</u>	17
<u>Figure 15 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Fulvia fulva</i> et le cycle seuil (Cp) pour les amores Cox1.1, Bc3 et CfActin.</u>	18
<u>Figure 16 : Évolution de la concentration d'ADN de <i>Phytophthora infestans</i> du jour 0 au jour 5 après inoculation</u>	19
<u>Figure 17 : Évolution de la concentration d'ADN de <i>Botrytis cinerea</i> du jour 0 au jour 4 après inoculation</u>	19
<u>Figure 18 : Évolution de la concentration d'ADN de <i>Pseudoidium neolycopersici</i> du jour 0 au jour 14 dans les modalités M1 (non inoculé), M2 (inoculation de <i>Fulvia fulva</i>), M3 (inoculation de <i>Pseudoidium neolycopersici</i>) et M4 (co-inoculation avec <i>Fulvia fulva</i>)</u>	20
<u>Figure 19 : Évolution de la concentration d'ADN de <i>Fulvia fulva</i> du jour 0 au jour 14 dans les modalités M2 (inoculation de <i>Fulvia fulva</i>) et M4 (co-inoculation avec <i>Pseudoidium neolycopersici</i>)</u>	20

<u>Tableau I : Caractéristiques des souches de <i>Fulvia fulva</i> utilisées pour les tests de spécificité...</u>	9
<u>Tableau II : Espèces fongiques cibles et non cibles utilisées pour l'évaluation de la spécificité des marqueurs moléculaires, avec leurs relations phylogénétiques.</u>	9
<u>Tableau III : Planification de la mise en place des bioessais du projet AGRIPOLHYS et des prélèvements foliaires réalisés pour les analyses de biologie moléculaire.</u>	10
<u>Tableau IV : Bioessais menés sur tomate en conditions contrôlées dans le cadre du projet AGRIPOLHYS depuis juillet 2024.</u>	11
<u>Tableau V : Amores et sondes utilisées pour la détection moléculaire des agents phytopathogènes du projet AGRIPOLHYS</u>	13
<u>Tableau VI : Fluorophores, quenchers et plages de détection associés aux sondes TaqMan employées pour la détection multiplex des agents phytopathogènes.</u>	13
<u>Tableau VII : Composition du mélange réactionnel pour une réaction de qPCR en simplex.</u>	13
<u>Tableau VIII : Disposition des échantillons sur la plaque PCR 384 puits utilisée pour la quantification de <i>Botrytis cinerea</i> par qPCR en simplex.</u>	14
<u>Tableau IX : Composition du mélange réactionnel pour une réaction de qPCR en multiplex.</u>	14
<u>Tableau X : Amores moléculaires utilisées pour la détection en simplex des agents phytopathogènes.</u>	15
<u>Tableau XI : Sondes moléculaires utilisées pour la détection en multiplex des agents phytopathogènes, précisant les marqueurs ciblés, le nom des sondes, le nombre minimal de différences nucléotidiques avec des souches non cibles.</u>	17
<u>Tableau XII : Spécificité et performance des systèmes multiplex pour la détection simultanée de <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Fulvia fulva</i>.</u>	18
<u>Tableau XIII : Cinétique d'apparition des symptômes foliaires sur feuilles de tomate inoculées avec quatre agents pathogènes lors des six bioessais réalisés en conditions contrôlées.</u>	19

I. Introduction générale

1) Contexte scientifique et enjeux phytosanitaires de la culture de la tomate

À l'échelle mondiale, les maladies des plantes représentent un enjeu majeur pour la sécurité alimentaire ainsi que pour le maintien d'une production mondiale suffisante. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, les pertes de rendement causées par ces maladies peuvent atteindre 20 à 40 % de la production agricole annuelle, ce qui entraîne des pertes économiques de plusieurs milliards d'euros chaque année (Savary *et al.*, 2019). Ces pertes touchent des cultures stratégiques comme le riz, le blé, le maïs, les pommes de terre et les cultures maraîchères, affectant les revenus des producteurs et la disponibilité des produits sur le marché.

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.), l'une des cultures maraîchères les plus cultivées au monde, est particulièrement vulnérable aux maladies fongiques. Ces maladies peuvent entraîner des pertes importantes en rendement et en qualité et elles nécessitent souvent des traitements phytosanitaires intensifs, ce qui pose des défis environnementaux et sanitaires considérables. Cette vulnérabilité est notamment accentuée dans les systèmes de production sous serre, où les conditions favorisent la propagation de microorganismes phytopathogènes (Strange *et al.*, 2005).

Face à ces enjeux, le projet AGRIPOLHYS (AGRiculture with Intelligent POLarimetric and HYperspectral Sensing) a été lancé. Ce programme de recherche et développement, conduit de 2024 à 2027, est coordonné par le LabISEN, laboratoire placé sous la tutelle exclusive d'Yncréa Ouest, établissement d'enseignement supérieur privé d'intérêt général (EESPIG), en partenariat avec les entreprises Photon Lines et Vegenov. Le budget total du projet s'élève à 332 500 €, financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), dans le cadre de l'appel à projets PRCE "Méthodologies, instrumentations, capteurs et solutions pour la transition écologique". Le projet AGRIPOLHYS vise à développer un outil innovant de détection précoce des maladies des plantes, en particulier chez la tomate, en s'appuyant sur la combinaison de technologies d'imagerie hyperspectrale et polarimétrique, associées à des analyses assistées par intelligence artificielle. L'objectif final est de concevoir un imageur spectro-polarimétrique* performant, capable de détecter les signatures optiques caractéristiques de quatre agents pathogènes de la tomate, *Phytophthora infestans*, *Pseudoidium neolycopersici*, *Botrytis cinerea* et *Fulvia fulva*, avant même l'apparition de symptômes visibles. Cet outil devrait permettre d'obtenir un diagnostic non destructif, rapide et précis de l'état sanitaire des cultures. Ce dispositif s'accompagne du développement de bases de données croisées, intégrant des données d'imagerie, biochimiques

* Définition dans le glossaire

et biomoléculaires, essentielles à l'apprentissage et à la validation de modèles d'intelligence artificielle.

Le projet est structuré autour de quatre grands axes de travail. Le premier axe concerne la conception et la fabrication d'un imageur spectro-polarimétrique innovant. Cette mission est portée par l'entreprise Photon Lines, spécialisée dans le développement de systèmes d'imagerie optique. L'objectif est de produire un dispositif capable de capter de manière fine les signatures optiques des plantes, en exploitant à la fois l'information spectrale et la polarisation de la lumière, pour révéler des altérations physiologiques non perceptibles à l'œil nu.

Le deuxième axe du projet AGRIPOLHYS consiste à constituer des bases de données complètes et multimodales en associant les images issues de l'imageur spectro-polarimétrique à des données biochimiques et moléculaires. Ce volet est conduit conjointement par le laboratoire LabISEN – Yncréa Ouest spécialisé en traitement d'image, imagerie hyperspectrale et intelligence artificielle et le centre technique Vegenov, spécialisé dans le domaine de la santé des plantes. Mon stage s'inscrit dans cet axe, au sein de Vegenov, où je participe au développement et à l'optimisation de méthodes de détection précoce des agents pathogènes en s'appuyant sur des approches moléculaires, notamment la PCR quantitative* (ou qPCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction), permettant une identification et une quantification précises des quatre agents phytopathogènes de la tomate. Vegenov utilise également des approches biochimiques, basées sur l'analyse des composés organiques volatils (VOCs) dont les profils constituent une signature spécifique permettant de distinguer les infections causées par les différents microorganismes phytopathogènes. Les données moléculaires et biochimiques sont ensuite intégrées aux bases de données du projet. Celles-ci sont essentielles pour l'entraînement et la validation des modèles prédictifs développés dans le cadre du projet AGRIPOLHYS, en vue d'une détection précoce, fiable et non destructive des maladies de la tomate.

Le troisième axe, coordonné par le LabISEN – Yncréa Ouest, concerne le développement de modèles d'intelligence artificielle capables de détecter et d'identifier précocement les maladies. LabISEN, en tant que coordinateur du projet, mobilise son expertise en traitement d'image, en apprentissage automatique et en imagerie hyperspectrale et polarimétrique pour extraire des informations pertinentes à partir des données collectées. Ces modèles visent à discriminer, de façon automatisée, des signaux précoce d'infection, avant même l'apparition de symptômes visibles.

Enfin, le quatrième axe porte sur la validation de l'imageur et des modèles d'intelligence artificielle dans des conditions réelles, notamment en serres. Vegenov et la station expérimentale du CATE assurent cette phase *via* des dispositifs expérimentaux similaires aux conditions de production des agriculteurs, afin de tester la robustesse et la transférabilité des résultats obtenus du laboratoire aux conditions de production.



Figure 1 : Symptômes de l'infection par *Phytophthora infestans* sur plant de tomate.

(a) Des lésions noires qui s'étendent se développent sur les feuilles. (b) Dans des conditions favorables, des branches entières (et éventuellement toute la plante) sont détruites. (c) Les fruits verts sont sensibles à l'infection et prennent une apparence marbrée brunâtre. (d) La sporulation de *P. infestans* se produit lorsque les feuilles infectées sont incubées en haute humidité, et est généralement visible sous la forme d'un duvet gris-blanc autour des bords des lésions nécrotiques plus foncées, surtout sur la face inférieure des feuilles (Griffith et al., 1995).



Figure 2 : Symptômes de l'infection par *Pseudoidium neolycopersici* sur plants de tomate (*Solanum lycopersicum* L. c.v. Admiro) 10 jours après inoculation (à Saint-Pol-de-Léon, le 13 mars 2025, Philomène Dubois).

2) Synthèse de la bibliographie existante

a) Principaux agents phytopathogènes de la tomate

La détection des microorganismes pathogènes, notamment fongiques, affectant la tomate constitue un sujet de recherche majeur, en raison de l'impact économique important de ces maladies sur la production agricole. Plusieurs agents pathogènes fongiques, tels que *Phytophthora infestans* (responsable du mildiou), *Botrytis cinerea* (pourriture grise), *Pseudoidium neolyopersici* (oïdium) et *Fulvia fulva* (cladosporiose), infestent différents organes de la plante, provoquant des symptômes variés allant des lésions foliaires et taches nécrotiques à la pourriture des fruits (Jones *et al.*, 2001 ; Williamson *et al.*, 2007 ; de Cara *et al.*, 2008 ; Fry, 2008).

L'espèce phytopathogène *Phytophthora infestans* appartient à la classe des oomycètes. Cet organisme est un oomycète hétérothallique présentant des cycles de reproduction sexuée et asexuée. Il est responsable du mildiou de la pomme de terre et de la tomate. Sur les tissus infectés, des sporangiophores portent des sporanges qui germent directement ou libèrent des zoospores biflagellées, mobiles en milieu aqueux, s'enkystant à la surface de la feuille pour émettre un tube germinatif et pénétrer l'hôte (Tucker et Talbot, 2001 ; Grenville-Briggs *et al.*, 2005 ; Fry 2008). Cet agent pathogène est hémibiotrophe, avec une phase biotrophe* asymptomatique de deux à quatre jours, suivie d'une phase nécrotrophe* où les tissus se nécrosent rapidement et la sporulation augmente. Le cycle complet peut s'achever en cinq jours dans des conditions optimales d'humidité élevée et de température allant de 20 à 25 °C (Andrivon, 1994 ; Judelson et Blanco 2005 ; Fry, 2008 ; Kamoun *et al.*, 2015). La maladie se manifeste par des lésions foliaires nécrotiques et un feutrage blanc sur la face inférieure des feuilles, ainsi que des pourritures des fruits, entraînant une forte réduction de la qualité marchande et des pertes de rendement pouvant dépasser 50 % en conditions favorables (Cooke *et al.*, 2012) (Figure 1).

L'agent phytopathogène responsable de l'oïdium de la tomate, *Pseudoidium neolyopersici*, est un champignon ascomycète biotrophe, de la classe des Leotiomycetes. Son cycle débute à la surface des feuilles, où des conidiophores produisent des conidies qui germent pour former un appressorium, permettant la pénétration de l'hôte. Le champignon développe ensuite un haustorium* intracellulaire pour extraire les nutriments sans tuer immédiatement les cellules. En conditions humides, les spores germent plus facilement, pénétrant aussi par les stomates ou blessures puis libèrent des enzymes et toxines entraînant la dégradation des tissus (Jones *et al.*, 2001). Cette maladie provoque un déficit photosynthétique et une réduction significative de la vigueur de la plante, entraînant des pertes de rendement souvent supérieures à 30 % en culture commerciale. Le champignon se développe entre 20 et 25 °C avec une humidité relative élevée (Cao *et al.*, 2021). Les symptômes se manifestent par un feutrage poudreux blanc à gris sur la face supérieure des feuilles, parfois accompagné de chloroses, déformations foliaires et lésions sur les pétioles, tiges ou fruits (Griffith *et al.*, 1995 ; Birch et Whisson, 2001) (Figure 2).



Figure 3 : Symptômes de l'infection par *Botrytis cinerea* sur plants de tomate (*Solanum lycopersicum L. c.v. Admiro*) 3 jours après inoculation (à Saint-Pol-de-Léon, le 16 mai 2025, Philomène Dubois).

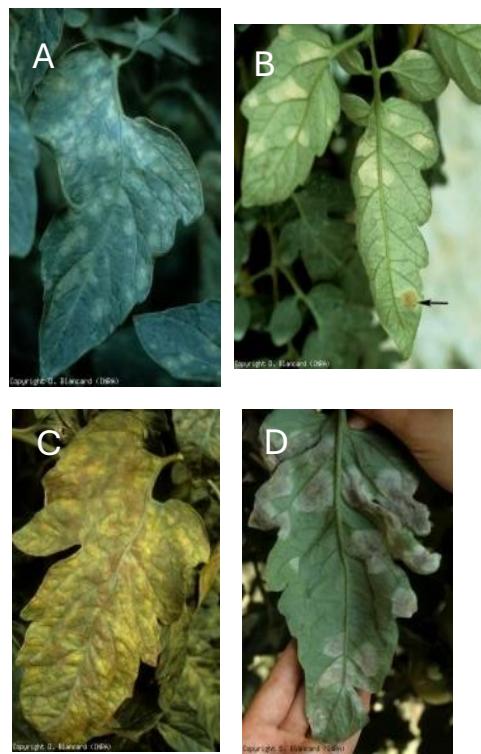


Figure 4 : Symptômes de l'infection par *Fulvia fulva* sur plants de tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

(a) Des taches vert pâle à contours flous apparaissent d'abord sur la face supérieure des folioles, évoluant ensuite vers une coloration jaune plus ou moins intense. (b) Un feutrage velouté brun violacé à gris se développe à l'emplacement des taches sur la face inférieure, correspondant à la sporulation du champignon sous forme de conidiophores et conidies brunâtres. (c) Lors d'infections sévères, la sporulation peut aussi être visible sur la face supérieure des feuilles. (d) En cas d'attaque avancée, les feuilles jaunissent entièrement, se dessèchent et perdent leur fonctionnalité photosynthétique (Photo A, B, C, D : Copyright D.Blancard (INRA), accessible sur le site Ephytia).

Botrytis cinerea est un champignon ascomycète de la classe des Leotiomycetes, responsable de la pourriture grise, une maladie commune affectant la tomate, la vigne, les fraises et de nombreuses plantes ornementales. Ce champignon nécrotrophe tue rapidement *les cellules végétales pour se nourrir* (Williamson *et al.*, 2007). Ses spores se dispersent par voie aérienne et peuvent infecter l'hôte *via* les blessures, les stomates ou directement à la surface. Une fois établi, *B. cinerea* sécrète des enzymes et des toxines provoquant une dégradation rapide des tissus (Eizner *et al.*, 2017 ; Bi *et al.*, 2023). Il se développe principalement en conditions humides avec des températures modérées entre 18 et 23 degrés et forme des sclérotes pour survivre hors de l'hôte. La pourriture grise entraîne des symptômes visibles comme des pourritures molles sur fruits, feuilles, tiges ou fleurs, souvent recouvertes d'un feutrage grisâtre (Williamson *et al.*, 2007) (Figure 3). Cette maladie cause d'importantes pertes de rendement, parfois supérieures à 40 %, en réduisant la qualité et la quantité des fruits récoltés, impactant fortement la productivité commerciale (Carisse et Van der Heyden, 2015).

Enfin, *Fulvia fulva* est un champignon ascomycète biotrophe de la classe des Dothideomycetes, responsable de la cladosporiose de la tomate. Ce champignon phytopathogène est un champignon biotrophe strict qui colonise la surface foliaire et pénètre passivement par les stomates. Il se développe dans l'apoplaste sans envahir les cellules vivantes, formant un réseau de hyphes* intercellulaires. Sa reproduction s'effectue *via* des conidiophores émergeant des stomates, libérant des conidies dispersées par voie aérienne. Le développement optimal de *F. fulva* survient à des températures modérées allant de 20 à 25 °C et sous forte humidité relative, conditions typiquement rencontrées en cultures sous serre (Latorre et Besoain 2002 ; Thomma *et al.*, 2005). La cladosporiose provoque l'apparition de taches chlorotiques à la face supérieure des folioles, évoluant en nécroses irrégulières. À terme, un feutrage brun à violacé apparaît sur la face inférieure. Ces lésions entraînent une réduction de la surface photosynthétique, un dessèchement foliaire prématué et une chute importante des feuilles, limitant le développement des fruits (Figure 4) (de Cara *et al.*, 2008). Dans les cas sévères, cette maladie peut causer des pertes de rendement allant de 15 à plus de 30 %, notamment en cultures sous serre mal ventilées ou non traitées (Pacific Northwest Pest Management Handbooks 2015). En cas d'infection sévère, cette sporulation peut aussi survenir sur la face supérieure, entraînant le jaunissement et le dessèchement complet des feuilles.

Ces agents phytopathogènes coexistent fréquemment dans les mêmes parcelles, rendant leur identification et leur gestion d'autant plus complexes. Cela souligne notamment la nécessité de méthodes de détection précoces, sensibles et spécifiques pour chaque espèce phytopathogène. En effet, l'importance d'une détection rapide et fiable de ces champignons pathogènes est largement reconnue, car elle permet une intervention précoce et ciblée, réduisant ainsi les pertes de récolte et limitant l'usage excessif de pesticides (Venbrux *et al.*, 2023).

Cependant, les méthodes traditionnelles, basées sur l'observation des symptômes ou sur des analyses microbiologiques classiques, sont souvent longues, peu sensibles aux stades précoce de l'infection et fortement dépendantes de l'expertise de l'opérateur (Gouriet *et al.*, 2009). Par exemple, la cladosporiose et l'oïdium présentent des symptômes foliaires similaires, tels que des taches chlorotiques et un feutrage en surface, rendant ainsi le diagnostic visuel peu fiable.

b) Méthodes de détection des agents pathogènes fongiques

La détection des agents pathogènes affectant la tomate constitue un enjeu majeur en recherche appliquée et l'application de techniques moléculaires, notamment la qPCR, a été particulièrement développée dans ce contexte.

La qPCR est devenue un outil de choix pour la détection précoce des agents pathogènes, en permettant de quantifier l'ADN des champignons, même avant l'apparition des symptômes visibles (Gachon et Saindrenan, 2004; Sharma *et al.*, 2024). Ces méthodes permettent ainsi une surveillance fine et rapide de la présence de ces agents pathogènes, condition essentielle pour une gestion efficace des maladies. Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes de détection par qPCR des agents pathogènes ciblés dans le projet AGRIPOLHYS. Ces méthodes reposent sur l'amplification de régions génétiques spécifiques, telles que les séquences *ITS* ou certains gènes fonctionnels, dont le choix dépend des espèces ciblées.

Pour *Phytophthora infestans*, différentes cibles ont été utilisées, telles que les régions *ITS1* (Lees *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2014) ou encore le gène *Ypt1* (Khan *et al.*, 2017). Le champignon *Pseudoidium neolyopersici* est principalement détecté à l'aide d'amorces ciblant les régions *ITS1* et *ITS2* (Kiss *et al.*, 2005). Pour *Botrytis cinerea*, les régions *ITS* (Suarez *et al.*, 2005) ainsi que des gènes codant pour des enzymes comme la cutinase A (Gachon et Saindrenan, 2004) sont couramment ciblés. Enfin, la détection de *Fulvia fulva* repose généralement sur des gènes d'effecteurs tels que *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* ou *Avr9* (Stergiopoulos *et al.*, 2007).

Cependant, plusieurs études ont mis en évidence un manque de spécificité de certaines de ces méthodes, en raison notamment d'amplifications non spécifiques entre espèces phylogénétiquement proches. C'est le cas pour le genre *Phytophthora* (Grünwald *et al.*, 2019 ; McCoy *et al.*, 2020) ou *Botrytis* (Suarez *et al.*, 2005).

Bien que certaines méthodes de détection de *Fulvia fulva* soient spécifiques, leur usage à grande échelle reste limité par la variabilité entre souches (Stergiopoulos *et al.*, 2007 ; Lucentini *et al.*, 2021 ; de la Rosa *et al.*, 2024). La diversité des méthodes publiées pour un même agent pathogène reflète donc la difficulté à établir une méthode de détection harmonisée et universellement reconnue.

Les travaux menés dans le cadre de la détection des agents phytopathogènes fongiques ont ainsi mis en évidence l'importance de la spécificité des amorces dans le développement de la qPCR. L'optimisation de ces amorces, en termes de sensibilité et de spécificité, ainsi que l'adaptation de la méthode aux différentes matrices d'échantillons, représentent des défis clés pour garantir une détection fiable dans des conditions agricoles réelles (Huggett *et al.*, 2005 ; Lievens *et al.*, 2006).

L'optimisation de ces amorces est cruciale, car la présence simultanée de plusieurs agents pathogènes dans un même échantillon peut engendrer des interférences et des faux positifs. Le multiplexage, qui permet de détecter simultanément plusieurs champignons phytopathogènes dans un même échantillon, représente une avancée notable, rendant l'analyse plus rapide et plus économique. Néanmoins, cette technique présente de nombreux défis, notamment le risque d'interférence entre les amorces et les sondes utilisées, ce qui nécessite une validation rigoureuse pour garantir la fiabilité des résultats (Venbrux *et al.*, 2023).

En parallèle des outils moléculaires, l'essor des technologies de phénotypage, comme l'imagerie hyperspectrale et l'imagerie polarimétrique, a ouvert de nouvelles perspectives pour la détection des maladies des plantes. Ces technologies permettent de détecter des altérations physiologiques dans les tissus végétaux bien avant l'apparition de symptômes visibles, offrant ainsi un outil puissant pour une détection précoce et non destructive des maladies (Mahlein, 2016 ; Mahlein *et al.*, 2018 ; Mahlein *et al.*, 2024). L'intégration des méthodes moléculaires, telles que la qPCR, avec des techniques d'imagerie optique avancées constitue une approche complémentaire prometteuse pour améliorer la détection précoce et précise des agents pathogènes de la tomate, contribuant ainsi au développement d'une agriculture de précision plus durable et respectueuse de l'environnement.

3) Problématique du travail et objectifs du stage

Dans un contexte de transition vers une agriculture plus durable, la détection précoce et fiable des maladies fongiques constitue un enjeu scientifique et technique majeur. Certaines méthodes moléculaires classiques employées pour la détection des agents pathogènes fongiques présentent encore des limites, notamment en termes de spécificité, ce qui peut affecter la fiabilité des résultats (Mahlein, 2016).

Par ailleurs, l'essor des données de séquençage génomique ouvre de nouvelles perspectives pour la conception d'approches plus précises et adaptées aux spécificités des microorganismes pathogènes ciblés (Schena *et al.*, 2013). Ces avancées sont particulièrement importantes dans le contexte de la détection précoce des maladies fongiques, étape cruciale pour une gestion efficace des cultures. Ces constats soulignent la nécessité de développer des méthodes moléculaires innovantes, combinant sensibilité et spécificité accrues, afin d'améliorer la surveillance phytopathologique (Sharma *et al.*, 2024).

Dans ce contexte, le projet AGRIPOLHYS vise à développer des outils d'imagerie hyperspectrale et polarimétrique pour une détection rapide et précoce des maladies fongiques de la tomate. Afin d'évaluer la pertinence et l'efficacité de ces technologies d'imagerie, il est indispensable de disposer de méthodes moléculaires de référence robustes, capables de confirmer la présence des agents pathogènes à un stade précoce, avant même l'apparition des symptômes visibles.

L'objectif de ce stage est de contribuer au développement et à l'optimisation de protocoles de qPCR ciblant spécifiquement quatre champignons pathogènes : *Phytophthora infestans*, *Pseudoidium neolyopersici*, *Botrytis cinerea* et *Fulvia fulva*. Ces protocoles s'appuieront sur la conception et l'évaluation d'amorces moléculaires, qu'elles soient issues de la littérature ou conçues *de novo* à l'aide d'analyses bioinformatiques. Les amorces seront évaluées selon des critères rigoureux tels que la spécificité, la sensibilité, ainsi que les limites de détection* (LOD) et de quantification* (LOQ). Ce travail vise à élaborer des protocoles de qPCR simplex* optimisés, permettant la détection spécifique et sensible d'un agent pathogène à la fois. L'objectif final est la mise au point d'un protocole de qPCR multiplex* capable de détecter simultanément plusieurs agents pathogènes dans un même échantillon, afin d'améliorer l'efficacité et la rapidité du diagnostic phytosanitaire.

Les méthodes développées seront ensuite validées expérimentalement sur des échantillons issus d'essais sur plantes, afin d'assurer leur fiabilité en conditions réelles. L'hypothèse de travail repose sur le fait que l'optimisation des outils moléculaires, notamment par la qPCR, permettra d'améliorer la détection précoce des champignons phytopathogènes, en augmentant la spécificité et la sensibilité des diagnostics tout en réduisant les coûts grâce au multiplexage.

Ce travail s'articule donc autour de trois axes complémentaires : développer des méthodes spécifiques et sensibles par la conception et la validation d'amorces en simplex, optimiser le coût et l'efficacité des diagnostics par le développement de protocoles multiplex intégrant des sondes spécifiques et enfin, apporter un soutien au projet ANR AGRIPOLHYS en analysant les échantillons issus des essais sur plantes afin de valider les corrélations entre les résultats moléculaires et les données d'imagerie hyperspectrale et polarimétrique.

La première partie de ce mémoire sera consacrée aux matériels et méthodes, où seront décrits les pathosystèmes étudiés ainsi que les analyses moléculaires réalisées. La seconde partie présentera les résultats obtenus, comprenant la validation expérimentale sur souches fongiques des amorces en simplex et multiplex et la validation expérimentale sur prélèvements issus des essais sur plantes. Enfin, la troisième partie proposera une discussion critique des résultats. Cette analyse évalue les performances et la pertinence des outils moléculaires développés en simplex et multiplex lors des essais sur plantes. Elle examinera notamment la corrélation entre les symptômes observés et les résultats de quantification moléculaire, tout en évaluant la contribution de ces données aux objectifs globaux du projet AGRIPOLHYS.



Figure 5 : Plants de tomate de l'essai 5 de la co-inoculation de *Pseudoidium neolycopersici* et *Fulvia fulva* en chambre de culture (à Saint-Pol-de-Léon, le 22 mai 2025, Philomène Dubois).

II. Matériels et méthodes

1) Pathosystèmes étudiés

a) Plante hôte : la tomate

i. Variété utilisée et sensibilité aux agents pathogènes

Dans l'ensemble des expérimentations menées dans le cadre du projet AGRIPOLHYS, la plante hôte utilisée est la variété commerciale de tomate Admiro (*Solanum lycopersicum* L. c.v. Admiro). Cette variété hybride est couramment employée en recherche agronomique et en essais phytopathologiques en raison de sa vigueur, de l'homogénéité de sa croissance et de sa bonne adaptabilité aux conditions expérimentales.

Le choix de cette variété repose sur sa sensibilité avérée aux quatre principaux agents pathogènes de la tomate ciblés dans ce projet ; *Phytophthora infestans*, *Pseudoidium neoly copersici*, *Botrytis cinerea* et *Fulvia fulva*. La sensibilité de la variété Admiro a été confirmée par des tests préliminaires menés en serre, consistant en des inoculations contrôlées avec des suspensions de spores des quatre agents pathogènes à différentes concentrations.

ii. Conditions de culture

Les plants de tomate sont cultivés en chambres de culture, en conditions contrôlées définies lors d'essais préliminaires, afin de favoriser l'expression des agents pathogènes (Figure 5). Ces conditions sont systématiquement appliquées dans le cadre du projet AGRIPOLHYS pour reproduire de façon contrôlée les pathosystèmes.

La photopériode est fixée à 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité. Pour les essais avec *P. infestans* et *B. cinerea*, les plants sont cultivés à une température comprise entre 18 et 20 °C, avec une hygrométrie proche de 100 %. Pour *P. neoly copersici* et *F. fulva*, l'hygrométrie est réglée autour de 80 % et la température varie de 20 °C la nuit à 23 °C le jour.

Deux solutions nutritives sont apportées durant la culture, chacune à une concentration de 4 g/L. La première solution (HLC35) contient 2 % d'azote, 1 % de phosphore, 3 % de potassium, 0,5 % de magnésium et des oligo-éléments, tandis que la seconde est constituée uniquement de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3).

b) Champignons phytopathogènes étudiés

i. Souches cibles et non cibles utilisées

Pour chaque agent pathogène, des souches cibles, sélectionnées pour leur agressivité avérée, sont utilisées pour les inoculations afin de garantir des infections reproductibles et représentatives des conditions naturelles. Une souche de référence est employée pour *P. infestans*, tandis qu'une

Tableau I : Caractéristiques des souches de *Fulvia fulva* utilisées pour les tests de spécificité. Les variétés de tomate sur lesquelles les isolats ont été obtenus sont indiquées, ainsi que la date et le lieu d'isolement. Les races physiologiques correspondantes y sont également précisées. Les couleurs attribuées à la colonne « Race » permettent d'identifier les souches appartenant à une même race physiologique, indépendamment des variations dans leurs profils de virulence (combinaisons de numéros).

Souche	Variétés de tomate d'isolement	Type de variété	Date	Lieu	Race
Ff9-2	?	?	2015	Hôpital Camfrout	2-3
Ff11H	Plaisance	Résistant	2017	Plouescat	1-2-3-9
Ff13F	Plaisance	Résistant	2018	Loperhet	1-2-3-9
Ff13I	Tontelle	Résistant	2018	Plougastel	1-2-3-9
Ff15B	Estatio	Résistant	2019	Plouguiel	1-2-3-9
Ff15G	Plaisance	Résistant	2019	Plougrescant	2-3-9
Ff16A	Luminance	Résistant	2020	Pl. Gautier	1-2-3-9
Ff16H	Codino	Résistant	2020	Savéol	2-3-6-9
Ff16I	Rubis	Sensible	2020	Savéol	2-3-6-9
Ff17A	Belle de cœur	Sensible	2021	Pl. Daoulas	1-2-3-6-9
Ff17B	Sweetelle	Résistant	2021	Pl. Daoulas	1-2-3-6-9
Ff17D	Portento	Résistant	2021	Paimpol	1-2-3
Ff17I	Sweetelle	Résistant	2021	Plouénan	1-2-9
Ff18A	Damaress	Résistant	2022	Plouénan	1-2-6-9

Tableau II : Espèces fongiques cibles et non cibles utilisées pour l'évaluation de la spécificité des marqueurs moléculaires, avec leurs relations phylogénétiques.

Espèce cible	Souches cibles	Espèce non cible	Numéro de souche	Relation phylogénétique avec l'espèce cible
<i>Phytophthora infestans</i>	PiPDT22.001	<i>Phytophthora ipomoeae</i>	CBS 122203	Même genre
		<i>Phytophthora phaseoli</i>	CBS 114105	
		<i>Phytophthora mirabilis</i>	CBS 122204	
<i>Pseudoidium neolycopersici</i>	Souche sauvage	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	BCTOM24-0001	<i>Botrytis fabae</i>	CBS 109.57	Même genre
<i>Fulvia fulva</i>	Ensemble des souches listées dans Tableau I	<i>Pantospora guazumae</i>	CBS 130299	Même famille (Mycosphaerellaceae), genre différent
		<i>Pantospora chromolaenae</i>	CBS 145563	
		<i>Cercospora beticola</i>	CBS 116505	

souche sauvage de *P. neolyopersici*, isolée sur tomate naine de la variété *Tasty* (*Solanum lycopersicum* L. c.v. *Tasty*) cultivée en serre, est utilisée pour les inoculations. Concernant le champignon *B. cinerea*, une souche sélectionnée pour son agressivité est choisie. Enfin, plusieurs souches de *F. fulva*, représentant différentes races physiologiques, sont utilisées afin de refléter la diversité de l'espèce (Tableau I). Parmi elles, la souche Ff11H est spécifiquement utilisée pour les pathosystèmes expérimentaux du projet.

Des souches non cibles de champignons phytopathogènes sont sélectionnées pour évaluer la spécificité des marqueurs moléculaires et le risque d'amplification croisée. Les souches non cibles sont phylogénétiquement proches des souches cibles, appartenant soit au même genre, comme *Phytophthora* pour *P. infestans* et *Botrytis* pour *B. cinerea*, soit à la même famille, Mycosphaerellaceae, mais à un genre différent, comme *Pantospora* et *Cercospora* pour *F. fulva*. Les souches, issues de la collection Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, ainsi que leurs numéros CBS et relations phylogénétiques, sont présentées dans le Tableau II.

ii. Maintien des souches et préparation des inocula et suspensions calibrées

Les souches des agents phytopathogènes sont maintenues dans des conditions spécifiques, adaptées à leurs conditions de croissance optimales.

L'agent pathogène *P. infestans* est cultivé sur un milieu nutritif à base de PDA, tandis que *B. cinerea* est conservé sous forme de sclérotes, puis transférés sur des milieux de culture V8. La souche Ff11H de *F. fulva* est également maintenue par repiquage sur un milieu nutritif V8. Les cultures sont ensuite stockées à température ambiante jusqu'à l'obtention de spores viables et abondantes, nécessaires à la mise en place des pathosystèmes expérimentaux. Le temps d'incubation varie selon les espèces : entre quatre à cinq jours pour *B. cinerea*, deux semaines pour *F. fulva* et trois semaines pour *P. infestans*. Le champignon obligatoire *P. neolyopersici*, ne pouvant être cultivé *in vitro*, est maintenu par recontamination régulière de plants de tomate naine en serre par pulvérisation de suspensions calibrées. Pour une conservation à moyen terme, certaines souches sont conservées à -20 °C dans des cryotubes afin de préserver leur viabilité.

Pour chaque agent pathogène, des suspensions de spores calibrées à une concentration optimale, sont préparées et utilisées comme inocula afin de garantir un développement symptomatique reproductible et quantifiable lors des essais. Pour cela, les spores de *P. infestans*, *B. cinerea* et *F. fulva* sont récoltées en ajoutant 10 mL d'eau stérile sur les cultures, puis en les détachant délicatement à l'aide d'un râteau stérile. Les suspensions obtenues sont filtrées à travers un filtre de 100 µm. La concentration en spores par millilitre est estimée à l'aide d'une cellule de Malassez. Pour ce faire, 180 µL de suspension sont déposés, les spores sont ensuite quantifiées et la concentration est estimée à l'aide du facteur standard (×4000). Les suspensions initiales sont ensuite centrifugées à 1200 tours par minute pendant 15 min à 4 °C.

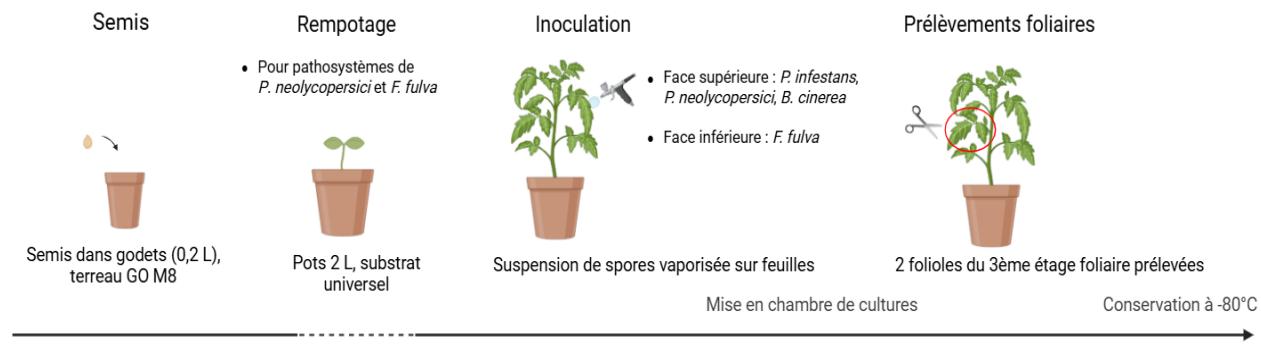


Figure 6 : Schéma du protocole expérimental des bioessais sur tomate selon les pathosystèmes dans le cadre du projet AGRIPOLHYS, comprenant les étapes de semis, rempotage, inoculation et prélèvements foliaires (Philomène Dubois, BioEdit).

Tableau III : Planification de la mise en place des bioessais du projet AGRIPOLHYS et des prélèvements foliaires réalisés pour les analyses de biologie moléculaire.

Le culot est remis en suspension dans un volume réduit pour constituer la solution mère, à partir de laquelle sont préparées des dilutions décimales successives de 10^6 à 10^2 spores/mL. Les suspensions sont ensuite conservées à -80°C .

c) Mise en place des bioessais

i. Déroulé d'un essai

Le déroulement des bioessais* comprend plusieurs étapes successives notamment le semis, le rempotage, l'inoculation, le prélèvement d'échantillons foliaires et la notation des symptômes.

Les graines de tomate sont semées individuellement dans des godets de 0,2 L contenant du terreau GO M8, composé de tourbe noire et de perlite. Pour les pathosystèmes *P. infestans* et *B. cinerea*, les plants sont maintenus dans ces godets initiaux pour l'ensemble de la durée des essais. Pour les agents pathogènes *P. neolyopersici* et *F. fulva*, les jeunes plants sont rempotés dans des pots de 2 L avec un substrat de rempotage universel, composé principalement de tourbe de sphagnum, fibres de coco et perlite.

L'inoculation est réalisée au stade de développement optimal des plants à partir de suspensions de spores calibrées selon les concentrations spécifiques à chaque agent pathogène. Ces suspensions sont appliquées par vaporisation foliaire jusqu'à la limite de ruissellement, sur la face supérieure des feuilles pour les agents phytopathogènes *P. infestans*, *P. neolyopersici* et *B. cinerea* et sur la face inférieure pour *F. fulva*. Les plants sont ensuite placés en chambre de culture en conditions contrôlées.

Des prélèvements foliaires sont réalisés à intervalles prédéfinis après inoculation, en fonction de l'apparition des symptômes spécifiques à chaque agent pathogène. Deux folioles du troisième étage foliaire de chaque plant sont collectées par modalité, codifiées pour assurer la traçabilité, puis conservées à -80°C en vue des analyses de biologie moléculaire (Figure 6).

La notation des symptômes, effectuée à certains jours de prélèvement pour chaque essai, permet d'évaluer l'apparition des premiers symptômes pour chaque modalité, ainsi que le pourcentage de surface foliaire affectée afin de mesurer l'intensité et la progression de la maladie.

ii. Description des bioessais réalisés

Dans le cadre du projet AGRIPOLHYS, plusieurs bioessais sont conduits en conditions contrôlées dans le but d'optimiser l'expression des symptômes foliaires et de valider les outils de détection moléculaire (Tableau III). Pour ce faire, deux types d'inoculation ont été mis en œuvre. D'une part, l'inoculation d'un seul agent pathogène et d'autre part, la co-inoculation de plusieurs agents pathogènes simultanément, permettant de simuler des situations de co-infections.

Tableau IV : Bioessais menés sur tomate en conditions contrôlées dans le cadre du projet AGRIPOLHYS depuis juillet 2024, présentant les différentes modalités et concentrations d'inoculation des quatre agents pathogènes étudiés, en simplex et en co-inoculation.

Numéro d'essai	Date	Type d'essai	Modalité	Agent(s) pathogène(s)	Concentration (spores/mL)
Essai 1	22/07/2024	Inoculation simple	M1	<i>Phytophthora infestans</i>	4 000
			M2	<i>Botrytis cinerea</i>	10 000
Essai 2	07/10/2024	Inoculation simple	M1	<i>Fulvia fulva</i>	80 000
			M2	<i>Pseudoidium neolyopersici</i>	20 000
Essai 3	03/03/2025	Inoculation simple et co-inoculation	M1	Non inoculé	-
			M2	<i>Fulvia fulva</i>	80 000
			M3	<i>Pseudoidium neolyopersici</i>	20 000
			M4	<i>F. fulva + P. neolyopersici</i>	80 000 + 20 000
			M5	<i>F. fulva + P. neolyopersici</i>	40 000 + 10 000
			M6	<i>F. fulva + P. neolyopersici</i>	20 000 + 5 000
Essai 4	14/04/2025	Inoculation simple	M1	<i>Phytophthora infestans</i>	4 000
	12/04/2025		M2	<i>Botrytis cinerea</i>	10 000
Essai 5	19/04/2025	Inoculation simple et co-inoculation	M1	Non inoculé	-
			M2	<i>Fulvia fulva</i>	80 000
			M3	<i>Pseudoidium neolyopersici</i>	20 000
			M4	<i>F. fulva + P. neolyopersici</i>	80 000 + 20 000
Essai 6	30/06/2025	Inoculation simple et co-inoculation	M1	<i>Phytophthora infestans</i>	4 000
			M2	<i>Botrytis cinerea</i>	10 000
			M3	<i>P. infestans + B. cinerea</i>	4 000 + 10 000
			M4	<i>P. infestans + B. cinerea</i>	2 000 + 5 000

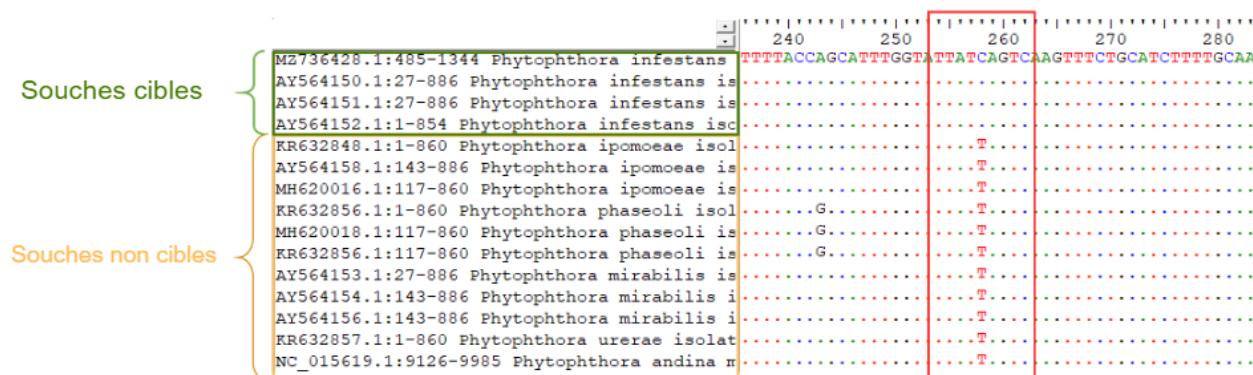


Figure 7 : Alignement de séquences nucléotidiques du gène Cox1 de souches du genre *Phytophthora*, réalisé avec le logiciel BioEdit (ClustalW). Les souches cibles appartenant à *Phytophthora infestans* sont encadrées en vert, tandis que les souches non cibles, phylogénétiquement proches mais appartenant à d'autres espèces du genre *Phytophthora*, sont encadrées en orange. La zone encadrée en rouge met en évidence une région présentant une variation nucléotidique spécifique à *P. infestans*, utilisée pour la conception d'amorces moléculaires spécifiques.

Les associations d'agents pathogènes en co-inoculation sont sélectionnées selon la synchronisation de leurs cycles infectieux et de l'apparition des symptômes (Tableau IV). Par exemple, *B. cinerea* et *P. infestans* provoquent des symptômes visibles entre 3 et 4 jours après l'inoculation, tandis que *F. fulva* et *P. neolyopersici* présentent une apparition plus tardive, entre 10 et 14 jours.

Parmi les essais réalisés, seuls les essais 4 et 5, présentant une expression symptomatique claire et quantifiable des agents pathogènes, ont été retenus pour les analyses moléculaires. La normalité des données est d'abord testée avec le test de Shapiro-Wilk. En l'absence de normalité, les comparaisons entre jours post-inoculation sont réalisées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. En cas de différence significative, des comparaisons multiples *post hoc* avec le test de Dunn permettent d'identifier précisément les jours présentant des différences. Un seuil de significativité est fixé à 0,05 pour l'ensemble des tests statistiques. Cette approche permet d'évaluer rigoureusement l'effet du facteur « Jour » sur la concentration d'ADN.

2) Analyses moléculaires

a) Développement des amorces moléculaires

i. Identification de marqueurs publiés ou développement de novo

Des amorces moléculaires* sont sélectionnées à partir de la littérature ou conçues *de novo* lorsque les marqueurs existants ne sont pas suffisamment spécifiques. Dans ce dernier cas, des recherches bibliographiques permettent d'identifier des gènes discriminants entre espèces proches au sein du même genre, tels que le gène mitochondrial *Cox1* pour *Phytophthora* et le gène β -*Tubuline* 2 pour *Oidium* (Grünwald *et al.*, 2019 ; Carey *et al.*, 2025). Les séquences nucléotidiques correspondantes à l'espèce pathogène cible sont extraites depuis la base NCBI en format FASTA, puis des séquences homologues sont obtenues *via* BLASTn. Les séquences sont ensuite alignées à l'aide du logiciel *BioEdit* afin d'identifier des régions nucléotidiques variables, spécifiques à l'espèce cible et permettant de la discriminer des espèces proches (Figure 7). Ces régions spécifiques servent de support à la conception d'amorces à l'aide de l'outil IDT PrimerQuest™ (Integrated DNA Technologies), qui cible précisément les variations nucléotidiques assurant une amplification spécifique de l'espèce d'intérêt.

ii. Analyses *in silico*

Les amorces moléculaires sont évaluées *in silico* à l'aide de Primer-BLAST (NCBI), pour détecter d'éventuelles amplifications croisées, en comparant leurs séquences aux séquences génomiques disponibles dans les bases de données publiques. Les espèces phylogénétiquement proches des espèces cibles, identifiées à partir de données taxonomiques (NCBI) et phylogénétiques issues de la littérature, sont ensuite sélectionnées (Abad *et al.*, 2023; Blair *et al.*, 2012; Lebeda *et al.*, 2024; Shin *et al.*, 2019; Fekrikohan *et al.*, 2024; Staats *et al.*, 2005; Bakhshi *et al.*, 2021).

Leurs séquences sont alignées avec plusieurs isolats de l'espèce cible à l'aide du logiciel BioEdit (ClustalW), pour repérer visuellement les régions d'homologie pouvant compromettre la spécificité des amorces. Cette approche combinée, alliant analyse phylogénétique et alignement multiple, permet ainsi de sélectionner uniquement les amorces présentant une spécificité optimale, avant validation expérimentale sur des souches non cibles.

iii. Validation expérimentale sur ADN des souches cibles et non cibles

a. Critères de spécificité

Les amorces sont testées par qPCR sur des souches cibles et non cibles présentant une similarité nucléotidique partielle pour confirmer leur spécificité. Pour les qPCR simplex, les courbes de fusion permettent de vérifier un pic unique et reproductible pour chaque amplicon. La normalité des températures de fusion est évaluée par le test de Shapiro-Wilk et, en cas de non-normalité, les comparaisons entre groupes cibles et non cibles sont effectuées par le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney (seuil de significativité fixé à 0,05). Pour les qPCR multiplex, la spécificité est évaluée par le suivi de l'amplification au cours du temps, en s'assurant de l'absence d'amplification croisée.

b. Validation d'une gamme étalon et détermination des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

La sensibilité des amorces est évaluée à l'aide d'une gamme étalon, préparée à partir d'une suspension de spores ajustée à 10^6 spores/mL, puis diluée en série jusqu'à 10^2 spores/mL. Après lyophilisation et extraction d'ADN, les échantillons sont analysés en réplicas par qPCR. La limite de détection (LOD) est définie comme la plus faible concentration d'ADN pour laquelle $\geq 95\%$ des réplicas présentent une amplification détectable. La limite de quantification (LOQ) correspond à la plus faible concentration détectée permettant une quantification fiable, déterminée comme la concentration pour laquelle le coefficient de variation (CV) entre réplicas est inférieur à 20 % (Forootan *et al.*, 2017). Pour chaque couple d'amorces, les courbes d'étalonnage sont tracées en représentant le logarithme de la concentration d'ADN en fonction des cycles seuil (Cp). Ces courbes permettent d'évaluer l'efficacité d'amplification, la linéarité, ainsi que la LOD et la LOQ, assurant ainsi la robustesse et la sensibilité des méthodes développées.

b) Préparation des échantillons

i. Lyophilisation et broyage des échantillons

Les échantillons foliaires sont conservés à -80 °C immédiatement après prélèvements pour préserver l'intégrité des ADN. Ils sont ensuite lyophilisés une nuit. Une bille métallique est ajoutée dans chaque tube, puis les échantillons sont broyés mécaniquement pendant 3 minutes à une fréquence de 25 tours par seconde, afin d'obtenir une poudre homogène.

Tableau V : Amorces et sondes utilisées pour la détection moléculaire des agents phytopathogènes du projet AGRIPOLHYS, précisant les marqueurs moléculaires ciblés, leur nom et leurs séquences nucléotidiques associés et l'origine des séquences.

Microorganisme	Région ou gène ciblé	Nom amorce / Sonde	Séquence nucléotidique	Origine (référence ou conception)
<i>Phytophthora infestans</i>	ITS	INF-FW2	TGGGCGAGCCCTATCAAAA	Hussain (2005)
		INF-REV	CCGATTCAAATGCCAAGCTAA	
	Cox1	Cox1.1-F	Donnée confidentielle	Design de novo
		Cox1.1-R	Donnée confidentielle	
		Cox1.1-Probe	Donnée confidentielle	
<i>Pseudoidium neolycopersici</i>	ITS	ON-F	CGCCAAGAGACCTAACCAAAA	Huibers <i>et al.</i> (2013)
		ON-R	AGCCAAGAGATCCGTTGTTG	
	β -Tubuline 2	OnTub2-F	Donnée confidentielle	Design de novo
		OnTub2-R	Donnée confidentielle	
		Tub2-Probe	Donnée confidentielle	
<i>Botrytis cinerea</i>	ITS	Bc3-F	GCTGTAATTCAATGTGCAGAACATCC	Suarez <i>et al.</i> (2005)
		Bc3-R	GGAGCAACAATTAATCGCATTTC	
		Bc3-Probe	TCACCTTGCAATGAGTGG	
<i>Fulvia fulva</i>	Actin	CfActin-F	GGCACCAATCAACCCAAAG	Mesarich <i>et al.</i> (2014)
		CfActin-R	TACGACCAGAAGCGTACAG	
		CfActin-Probe	Donnée confidentielle	

Tableau VI : Fluorophores, quenchers et plages de détection associés aux sondes TaqMan employées pour la détection multiplex des agents phytopathogènes.

Sonde	Fluorophore	Quencher	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
Cox1.1-Probe	ATTO 425	Iowa Black FQ (BHQ-1)	435	483
CfActin-Probe	5-TAMRA	Iowa Black RQ (BHQ-2)	546	579
Tub2-Probe	LightCycler 640	Iowa Black RQ (BHQ-2)	620	640
Bc3-Probe	6-FAM	BHQ2	495	520

Tableau VII : Composition du mélange réactionnel pour une réaction de qPCR en simplex.

Composant	Concentration initiale (μ M)	Concentration finale (μ M)	Volume par réaction (μ L)
Eau ultrapure	-	-	2,8
Amorce sens (forward)	100 μ M	0,1 μ M	0,1
Amorce antisens (reverse)	100 μ M	0,1 μ M	0,1
Master Mix	2X	1X	5,0
Volume mix	-	-	8,0
ADN matrice	-	-	2,0
Volume total de la réaction	-	-	10,0

ii. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit MN « Genomic DNA from FOOD » (Macherey-Nagel). Pour chaque échantillon foliaire, entre 20 et 40 mg de feuilles lyophilisées et broyées sont utilisés. Les suspensions calibrées de spores sont utilisées tels quels après lyophilisation et broyage. Le protocole a été suivi conformément aux recommandations du fabricant, incluant la lyse cellulaire ainsi que les étapes de lavage, séchage et élution de l'ADN (Annexe I). Puis, les extraits d'ADN sont répartis dans une plaque 96 puits, dosés au spectrophotomètre et conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

c) Protocoles de qPCR

i. Amorces et sondes moléculaires utilisées

Les amorces utilisées pour la détection des agents phytopathogènes sont issues de la littérature scientifique et de développements internes réalisés à Vegenov. Les couples d'amorces et la sonde TaqMan® déjà employés pour *B. cinerea* sont conservés, en raison de leur spécificité et sensibilité avérées (Suarez *et al.*, 2005). Pour *F. fulva*, les amorces simplex présentent une spécificité satisfaisante, mais une sonde spécifique est développée afin de l'intégrer dans une détection multiplex. En revanche, les amorces initialement disponibles pour *P. infestans* et *P. neolycopersici* s'avèrent insuffisantes, ce qui conduit à la conception de nouveaux couples d'amorces et sondes adaptés au multiplexage (Tableau V).

Les sondes d'hydrolyse sont marquées par des fluorophores distincts associés à des quenchers, sélectionnés selon le catalogue IDT Dye pour une séparation spectrale optimale avec le système LightCycler®480 (Roche) (Tableau VI). Chaque fluorophore est associé à une sonde spécifique développée à partir des amorces simplex de chaque agent phytopathogène. Quatre plages spectrales distinctes ont été retenues, assurant la séparation des signaux et évitant ainsi les recouvrements et interférences. Ce choix optimisé garantit la sensibilité et la spécificité des réactions multiplexées. La sélection des fluorophores et leur compatibilité avec le système LightCycler® 480 sont présentés en Annexe II, tandis que les filtres disponibles et leurs combinaisons possibles pour chaque fluorophore figurent en Annexe III.

ii. Préparation des mélanges réactionnels

Pour les analyses en simplex, un mélange réactionnel est préparé pour chaque couple d'amorces. Le volume est ajusté en fonction du nombre d'échantillons à analyser, avec un excédent pour compenser les pertes liées au pipetage. Chaque réaction, contient 8 µL de mélange réactionnel et 2 µL d'ADN matrice. Le mélange comprend de l'eau ultrapure, des amorces sens et antisens à 0,1 µM, ainsi qu'un Master Mix contenant le colorant intercalant SYBR Green (LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) ou Takyon™ SYBR MasterMix (Eurogentec)), selon les conditions expérimentales (Tableau VII). Cette approche inclut

Tableau VIII : Disposition des échantillons sur la plaque PCR 384 puits utilisée pour la quantification de *Botrytis cinerea* par qPCR en simplex.

	1	2	3	4	5	6	7
A	E4BcJ0P1	E4BcJ3P1	E4BcJ0P1	E4BcJ3P1			
B	E4BcJ0P1	E4BcJ3P1	E4BcJ0P1	E4BcJ3P1			
C	E4BcJ0P2	E4BcJ3P2	E4BcJ0P2	E4BcJ3P2			
D	E4BcJ0P2	E4BcJ3P2	E4BcJ0P2	E4BcJ3P2			
E	E4BcJ0P3	E4BcJ3P3	E4BcJ0P3	E4BcJ3P3			
F	E4BcJ0P3	E4BcJ3P3	E4BcJ0P3	E4BcJ3P3			
G	E4BcJ1P1	E4BcJ4P1	E4BcJ1P1	E4BcJ4P1			
H	E4BcJ1P1	E4BcJ4P1	E4BcJ1P1	E4BcJ4P1			
I	E4BcJ1P2	E4BcJ4P2	E4BcJ1P2	E4BcJ4P2			
J	E4BcJ1P2	E4BcJ4P2	E4BcJ1P2	E4BcJ4P2			
K	E4BcJ2P1	E4BcJ4P3	E4BcJ2P1	E4BcJ4P3			
L	E4BcJ2P1	E4BcJ4P3	E4BcJ2P1	E4BcJ4P3			
M	E4BcJ2P2	T+ Bc	E4BcJ2P2	T+ tomate			
N	E4BcJ2P2	T+ Bc	E4BcJ2P2	T+ tomate			
O	E4BcJ2P3	T-	E4BcJ2P3	T-			
P	E4BcJ2P3	T-	E4BcJ2P3	T-			
Marqueurs moléculaires	Bc3		UBI				

Tableau IX : Composition du mélange réactionnel pour une réaction de qPCR en multiplex.

Composant	Concentration initiale (μM)	Concentration finale (μM)	Volume par réaction (μL)
Eau ultrapure	—	—	3,55
Cox1.1-F	100	0,3	0,06
Cox1.1-R	100	0,3	0,06
Cox1.1-Probe	100	0,15	0,03
Bc3-F	100	0,3	0,06
Bc3-R	100	0,3	0,06
Bc3-Probe	100	0,15	0,03
CfActin-F	100	0,3	0,06
CfActin-R	100	0,3	0,06
CfActin-Probe	100	0,15	0,03
Master Mix PCR	2X	1X	10
Total mix	—	—	14
ADN matrice	—	—	6
Volume total de la réaction	—	—	20 μL

également un témoin endogène* basé sur l'amplification d'un fragment du gène constitutif de l'ubiquitine de la tomate, permettant de contrôler la qualité de l'ADN extrait, la présence d'éventuels inhibiteurs et les amplifications non spécifiques. Pour ce témoin, un mélange réactionnel spécifique aux amores UBI est préparé, auquel 1 µL d'ADN de tomate est ajouté. Après homogénéisation, 8 µL du mélange réactionnel sont répartis dans chaque puits d'une plaque PCR 384 puits, puis complétés avec 2 µL d'ADN. Après distribution des mélanges et des échantillons d'ADN, la plaque est immédiatement scellée. La disposition des puits est illustrée dans le tableau VIII.

Pour le multiplexage, le mélange réactionnel permet de détecter simultanément *P. infestans*, *F. fulva* et *B. cinerea*, la sonde spécifique à *P. neolyopersici* n'étant pas encore disponible. Chaque réaction de qPCR, d'un volume total de 20 µL, comprend 14 µL de mélange réactionnel et 6 µL d'ADN matrice, correspondant à 2 µL par agent pathogène analysé, assurant une représentation équitable. Le mélange réactionnel contient les amores sens et antisens associées à chaque microorganisme, à une concentration finale de 0,3 µM, ainsi que les sondes TaqMan à 0,15 µM, préparées à partir de solutions mères à 100 µM. Le Master Mix utilisé est le LightCycler® Multiplex Probes Master (Roche) et le volume final de chaque réaction est complété avec de l'eau ultrapure (Tableau IX). Ces conditions ont été ajustées conformément à des protocoles validés dans la littérature, démontrant leur efficacité pour des applications en qPCR multiplex (Schena *et al.*, 2013; Almeida-de-Oliveira *et al.*, 2019).

iii. Amplification par qPCR

L'amplification par qPCR sur le LightCycler® 480 II (Roche) est réalisée selon deux protocoles distincts, adaptés à la stratégie de détection utilisée : SYBR Green ou TaqMan.

Le protocole SYBR Green repose sur l'utilisation du colorant intercalant fluorescent, qui se fixe spécifiquement à l'ADN double brin. L'amplification est effectuée selon le programme AGRO 384 et comprend 45 cycles d'amplification. Chaque réaction débute par une dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 minutes, suivie de 45 cycles comprenant : une dénaturation à 94 °C pendant 15 secondes, une hybridation des amores à 60 °C pendant 30 secondes, puis une élongation à 72 °C pendant 30 secondes. Après l'amplification, une courbe de fusion (melting curve) est réalisée pour vérifier la spécificité des produits amplifiés.

Le protocole TaqMan repose sur l'utilisation de sondes d'hydrolyse spécifiques, marquées par des fluorophores et permettant une détection multiplexe. Au cours de l'amplification, l'hydrolyse enzymatique des sondes génère un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN cible amplifiée. La fluorescence est détectée en temps réel, par le LightCycler® 480 via le programme TaqMan-Agripholys. Le programme commence par une dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 minutes, suivie de 35 cycles comprenant : une dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes, puis une hybridation et une élongation à 60 °C pendant 60 secondes.

Tableau X : Amorces moléculaires utilisées pour la détection en simplex des agents phytopathogènes, précisant les région ou gènes ciblés, le nom des amorces, le nombre minimal de différences nucléotidiques avec des souches non cibles et leur validation *in silico* (alignements BioEdit et recherches via Primer-BLAST).

Microorganisme	Région ou gène ciblé	Nom des amorces	Définitions nucléotidiques minimales	Validation <i>in silico</i>
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>ITS</i>	INF-FW2 / INF-REV	0	Spécificité insuffisante
	<i>Cox1</i>	Cox1.1-F / Cox1.1-R	≥1	Spécifique confirmée
<i>Pseudoidium neolyopersici</i>	<i>ITS</i>	ON-F / ON-R	0	Spécificité insuffisante
	β -Tubuline 2	OnTub2-F / OnTub2-R	≥2	Spécifique confirmée
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>ITS</i>	Bc3-F / Bc3-R	≥2	Spécifique confirmée
<i>Fulvia fulva</i>	<i>Actin</i>	CfActin-F / CfActin-R	≥2	Spécifique confirmée

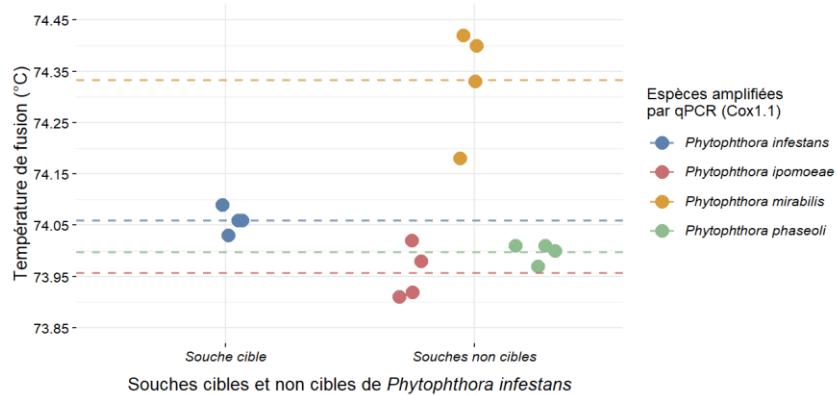


Figure 8 : Analyse des températures de fusion des produits amplifiés avec les amorces Cox1.1. Les amorces ont été testées sur des souches cibles de *P. infestans* et sur des souches non cibles (*P. ipomoeae*, *P. phaseoli*, *P. mirabilis*). Les températures de fusion diffèrent peu entre groupes, et le test de Wilcoxon-Mann-Whitney ne révèle pas de différence significative ($p = 0,36$).

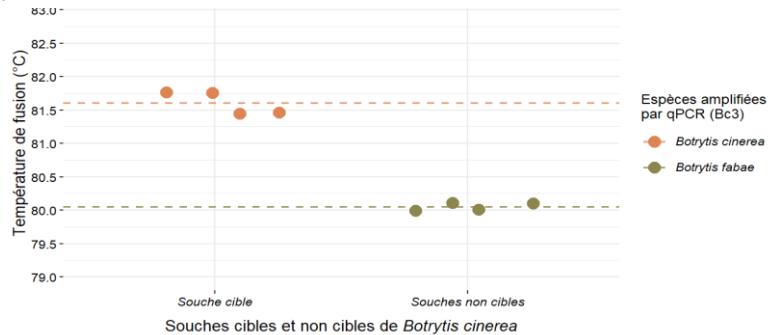


Figure 9 : Analyse des températures de fusion des produits amplifiés avec les amorces Bc3. Les amorces ont été testées sur des souches cibles de *Botrytis cinerea* et sur l'espèce non cible *B. fabae*. Les températures de fusion diffèrent significativement entre les groupes, avec $81,50 \pm 0,006$ °C pour les cibles et $80,10 \pm 0,06$ °C pour les non cibles (test de Wilcoxon-Mann-Whitney, $p = 0,029$).

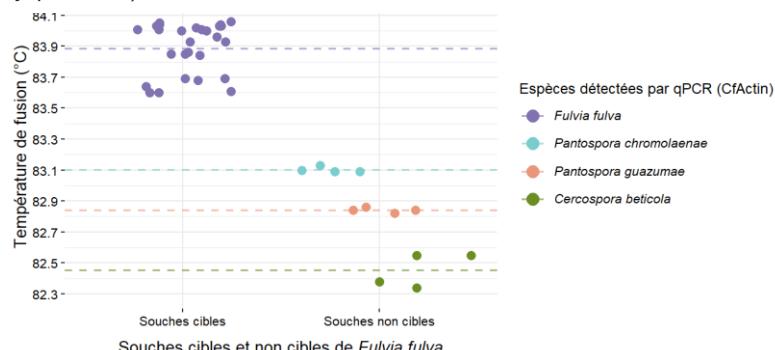


Figure 10 : Analyse des températures de fusion des produits amplifiés avec les amorces CfActin. Les amorces ont été testées sur 14 souches cibles de *F. fulva* et sur des souches non cibles (*Pantospora chromolaenae*, *P. guazumae* et *Cercospora beticola*). Les températures de fusion diffèrent significativement entre les groupes, avec $83,88 \pm 0,16$ °C pour les cibles et $82,80 \pm 0,28$ °C pour les non cibles (test de Wilcoxon-Mann-Whitney, $p = 0,029$).

III. Résultats

1) Analyse des amorces moléculaires en simplex

a) Résultats *in silico*

L'analyse *in silico* des amorces couramment utilisées chez Vegenov évalue leur spécificité vis-à-vis des agents pathogènes ciblés. Les amorces Bc3 ciblant *Botrytis cinerea* et CfActin dirigées contre *Fulvia fulva* montrent une spécificité satisfaisante selon les alignements multiples et Primer-BLAST, avec au moins 2 différences nucléotidiques vis-à-vis des espèces non cibles. En revanche, les amorces INF et ON, ciblant respectivement *Phytophthora infestans* et *Pseudoidium neolyopersici*, présentent une spécificité limitée en raison de la conservation partielle des séquences chez des espèces proches, ce qui entraîne un risque d'amplification non spécifique. Pour y remédier, de nouvelles amorces spécifiques ont été conçues *de novo*, ciblant le gène Cox1 pour *P. infestans* (Cox1.1, ≥ 1 différence nucléotidique) et le gène β -Tubuline 2 pour *P. neolyopersici* (OnTub2, ≥ 2 différences). Comme le résume le Tableau X, ces nouvelles amorces ainsi que celles pour *B. cinerea* et *F. fulva* confirment une spécificité adaptée, réduisant le risque d'amplification non spécifique.

b) Résultats expérimentaux : spécificité sur souches cibles et non cibles

La spécificité des amorces est évaluée par qPCR sur des panels de souches cibles et non cibles. Aucun signal n'est détecté dans les témoins négatifs, confirmant l'absence d'amplifications non spécifiques. Les distributions de températures de fusion n'étant pas normales (Shapiro-Wilk, *p*-value < 0,05), les comparaisons entre souches cibles et non cibles sont réalisées avec le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Les amorces Cox1.1 sont testées sur des souches cibles de *P. infestans* et non cibles appartenant à trois espèces proches : *P. ipomoeae*, *P. phaseoli* et *P. mirabilis*. Les températures de fusion des produits amplifiés diffèrent peu entre les groupes, avec des moyennes de $74,13 \pm 0,16$ °C (*n* = 12) pour les souches cibles et $74,05 \pm 0,03$ °C (*n* = 4) pour les non cibles, dont les valeurs varient de 73,91 à 74,42 °C selon l'espèce (Figure 8). Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney ne révèle pas de différence significative entre les deux groupes (*p*-value = 0,36).

Pour *B. cinerea*, les amorces Bc3 présentent des profils de fusion distincts entre la souche cible et l'espèce non cible *B. fabae*. Les Tm mesurées sont de $81,50 \pm 0,006$ °C (*n*=3) pour les souches cibles et de $80,10 \pm 0,06$ °C (*n* = 4) pour les souches non cibles (Figure 9). L'écart moyen de 1,4 °C est statistiquement significatif selon le test de Wilcoxon-Mann-Whitney (*p*-value = 0,029).

Les amorces CfActin, testées sur 14 souches de *F. fulva* et sur des souches non cibles (*Pantospora chromolaenae*, *P. guazumae* et *Cercospora beticola*) montrent des températures de fusion homogènes chez les souches cibles ($83,88 \pm 0,16$ °C, *n* = 28), tandis que celles des souches non cibles sont plus basses, avec une moyenne de $82,80 \pm 0,28$ °C (*n* = 12) (Figure 10).

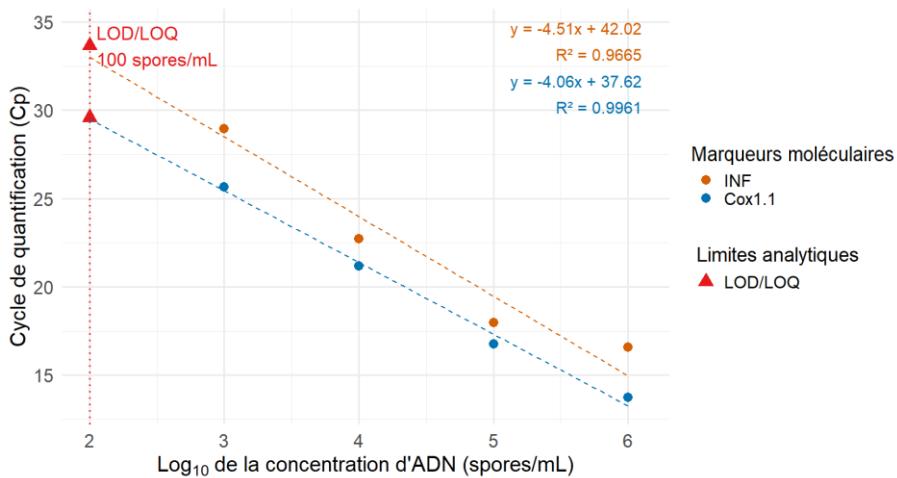


Figure 11 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de *Phytophthora infestans* et le cycle seuil (Cp) pour les amores INF et Cox1.1. Les Cp présentent une relation linéaire inversement proportionnelle au logarithme de la concentration, avec des coefficients de détermination élevés ($R^2 = 0,9665$ pour INF et 0,9961 pour Cox1.1). Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont fixées à 10^2 spores/mL.

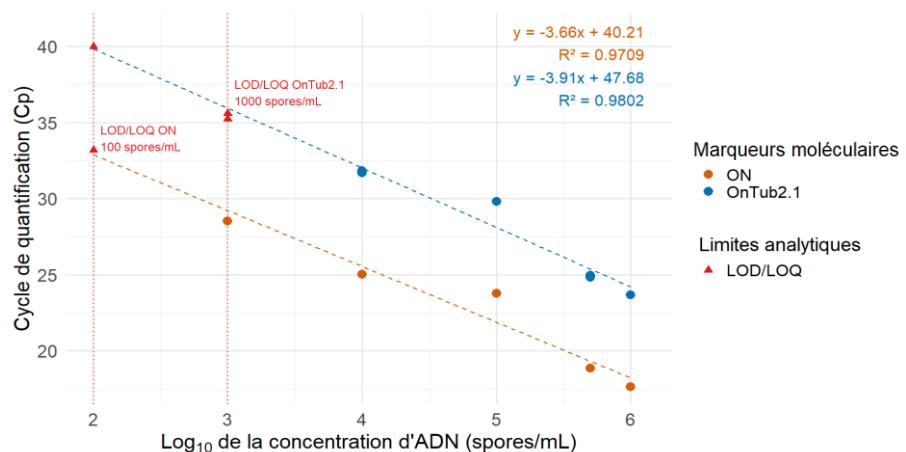


Figure 12 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de *Pseudoidium neolyccopersici* et le cycle seuil (Cp) pour les amores ON et OnTub2.1. Les Cp présentent une relation linéaire inversement proportionnelle au logarithme de la concentration, avec des coefficients de détermination élevés ($R^2 = 0,9709$ pour ON et 0,9802 pour OnTub2.1). Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont fixées à 10^2 spores/mL pour ON et à 10^3 spores/mL pour OnTub2.1.

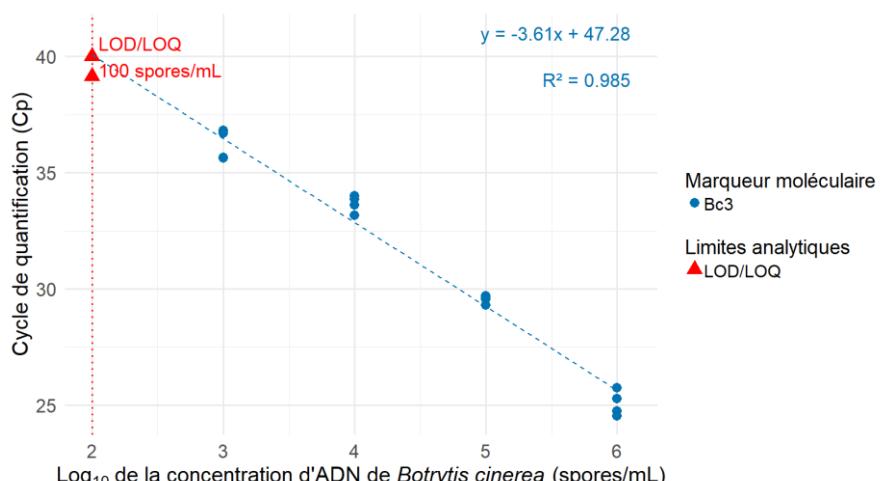


Figure 13 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de *Botrytis cinerea* et le cycle seuil (Cp) pour l'amorce Bc3. Les Cp présentent une relation linéaire inversement proportionnelle au logarithme de la concentration ($R^2 = 0,985$). La limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) est fixée à 10^2 spores/mL.

Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney met en évidence une différence significative entre les deux groupes (p -value = 0,029).

c) Performances analytiques (courbes d'étalonnage, LOD, LOQ)

Les performances analytiques des couples d'amorces sont évaluées à partir de gammes étalons préparées à partir de suspensions calibrées de spores, diluées de 10^6 à 10^2 spores/mL. Pour tous les agents pathogènes étudiés, le cycle seuil* (Cp) mesuré par qPCR présente une relation inversement linéaire avec le logarithme de la concentration, confirmant la robustesse et la linéarité des amorces. Cette linéarité est appuyée par des coefficients de détermination (R^2) élevés pour chaque courbe, attestant de la qualité de l'étalonnage.

Pour *P. infestans*, les amorces INF et Cox1.1 génèrent des Cp moyens compris respectivement entre 16,59 et 33,66 pour INF et entre 13,74 et 29,59 pour Cox1.1, selon les dilutions de la suspension initiale. Les coefficients de variation (CV) totaux sont inférieurs à 2 % pour toutes les dilutions jusqu'à 10^2 spores/mL, attestant d'une très bonne reproductibilité des mesures au sein des séries et entre répétitions indépendantes. La linéarité de la courbe d'étalonnage est confirmée par un coefficient R^2 de 0,9665 pour INF et 0,9961 pour Cox1.1, indiquant une corrélation forte entre Cp et logarithme de la concentration. La LOD et la LOQ sont établies à 10^2 spores/mL, correspondant à la concentration minimale détectable et quantifiable avec un CV inférieur à 20 %, ce qui confirme la sensibilité et la fiabilité de ces amorces pour la détection de faibles quantités de spores (Figure 11).

Pour *P. neolyopersici*, les amorces ON et OnTub2.1 présentent des Cp moyens allant de 17,65 à 33,21 pour ON et de 23,68 à 40 pour OnTub2.1. Le CV total reste inférieur à 1,2 % pour les dilutions jusqu'à 10^2 spores/mL, démontrant une très bonne reproductibilité intra- et inter-série. Les courbes d'étalonnage affichent des R^2 de 0,9709 pour ON et 0,9802 pour OnTub2.1, confirmant une quantification fiable et linéaire sur toute la gamme de concentrations testée. La LOD et la LOQ sont fixées à 10^2 spores/mL pour ON, tandis que pour OnTub2.1, elles sont établies à 10^3 spores/mL, les signaux n'étant pas systématiquement détectés à 10^2 spores/mL. Cela indique que les amorces ON permettent une détection et une quantification fiables à partir de faibles concentrations, alors que les amorces OnTub2.1 nécessitent une concentration minimale plus élevée pour assurer la même fiabilité (Figure 12).

Pour *B. cinerea*, les amorces Bc3 affichent des Cp moyens compris entre 25,01 et 40, avec un CV total inférieur à 3,5 % sur l'ensemble des dilutions testées. La linéarité de la courbe est soutenue par un R^2 de 0,985. La LOD et la LOQ sont fixées à 10^2 spores/mL, indiquant que cette amorce permet une détection systématique et une quantification fiable à partir de cette concentration. La reproductibilité des mesures est également confirmée par une variabilité limitée entre les répétitions, garantissant une quantification précise dans la gamme étudiée (Figure 13).

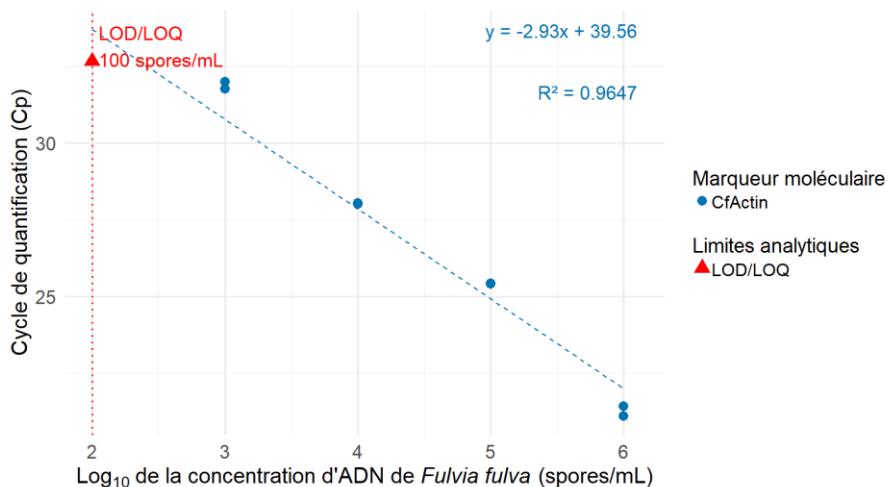


Figure 14 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de *Fulvia fulva* et le cycle seuil (Cp) pour l'amorce CfActin. Les Cp présentent une relation linéaire inversement proportionnelle au logarithme de la concentration ($R^2 = 0,9647$). La limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) est fixée à 10^2 spores/mL.

Tableau XI : Sondes moléculaires utilisées pour la détection en multiplex des agents phytopathogènes, précisant les marqueurs ciblés, le nom des sondes, le nombre minimal de différences nucléotidiques avec des souches non cibles.

Microorganisme	Marqueur moléculaire	Nom de la sonde	Différences nucléotidiques minimales
<i>Phytophthora infestans</i>	Cox1	Cox1.1-Probe	0
<i>Pseudoidium neolyccopersici</i>	β -Tubuline 2	Tub2-Probe	≥ 1
<i>Botrytis cinerea</i>	ITS	Bc3-Probe	≥ 1
<i>Fulvia fulva</i>	Actin	CfActin-Probe	≥ 1

Pour *F. fulva*, les amorces CfActin montrent une linéarité stable sur toute la gamme de concentrations, avec des Cp moyens variant de 21,41 à 32,67 et un CV total inférieur à 1,1 %. Le R² de la courbe d'étalonnage est de 0,9647, confirmant la robustesse de la linéarité des concentrations de la suspension calibrée. La LOD et la LOQ sont établies à 10² spores/mL, et assurant une détection constante et une faible variabilité intra-série, même pour de faibles concentrations de spores (Figure 14).

Ces résultats indiquent que tous les couples d'amorces testés permettent une quantification précise, reproductible et sensible des agents pathogènes étudiés. La linéarité observée, corroborée par les R² élevés, associée à de faibles coefficients de variation et à des limites de détection basses, confirme que ces amorces constituent des outils fiables pour la détection et la quantification des spores dans des conditions expérimentales contrôlées.

2) Analyse des amorces moléculaires en multiplex

a) Résultats *in silico* et vérification des interactions croisées

Les alignements multiples des marqueurs moléculaires utilisés en multiplex mettent en évidence une spécificité marquée entre les souches cibles et non cibles, ce qui réduit le risque d'amplification non spécifique. Les sondes Tub2-Probe (*P. neolyopersici*), Bc3-Probe (*B. cinerea*) et CfActin-Probe (*F. fulva*) présentent chacune au moins une différence nucléotidique avec les séquences des souches non cibles, renforçant la spécificité du système en complément des amorces simplex. En revanche, la sonde Cox1.1-Probe (*P. infestans*) ne présente aucune différence avec certaines séquences non cibles, ce qui limite son pouvoir discriminant (Tableau XI).

b) Résultats expérimentaux (spécificité sur souches cibles et non cibles)

Les systèmes multiplex présentent certaines limitations, notamment l'impossibilité de différencier tous les marqueurs moléculaires. La spécificité est évaluée à l'aide de témoins positifs, témoins négatifs et souches non cibles. Aucun signal d'amplification n'est détecté dans les témoins négatifs, confirmant l'absence de contamination. Pour *P. infestans*, les témoins positifs produisent des Cp attendus sur le canal Atto425 à 19,53 et un signal sur FAM à 19,45. Les espèces non cibles *P. mirabilis* et *P. ipomoeae* présentent des amplifications croisées précoces sur Atto425 et FAM, avec des Cp compris entre 13,47 et 16,15, tandis que *P. phaseoli* génère un signal plus tardif, avec des Cp compris entre 26,56 et 26,63, révélant une amplification non spécifique sur ces deux canaux.

Pour *B. cinerea*, les témoins positifs fournissent des signaux tardifs à un Cp de 30 sur le canal correspondant FAM, ainsi que sur le canal Atto425. La sonde Bc3-Probe montre donc des défaillances, le témoin positif n'ayant pas été amplifié correctement. Les témoins positifs de *F. fulva* montrent un signal sur TAMRA à 28,5 et aucun signal sur les canaux Atto425 ou FAM.

Tableau XII : Spécificité et performance des systèmes multiplex pour la détection simultanée de *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* et *Fulvia fulva*. Les Cp sont mesurés sur les canaux Atto425, FAM et TAMRA pour les souches cibles et non cibles. Pour *P. infestans*, le signal attendu est sur Atto425 ; pour *B. cinerea*, sur FAM ; et pour *F. fulva*, sur TAMRA. Les éventuelles amplifications croisées sont indiquées pour chaque canal.

Agent pathogène cible	Échantillon	Catégorie de souche	Atto425	FAM	TAMRA	Spécificité et amplification croisée
<i>Phytophthora infestans</i>	Témoin + <i>P. infestans</i>	Cible	19,53	19,45	-	Signal attendu sur Atto425 Amplification croisée faible sur FAM
	<i>P. mirabilis</i>	Non-cible	16,15	16,13	-	Amplification croisée sur Atto425 et FAM
	<i>P. ipomoeae</i>	Non-cible	13,54	13,47	-	Amplification croisée sur Atto425 et FAM
	<i>P. phaseoli</i>	Non-cible	26,56	26,63	-	Amplification croisée sur Atto425 et FAM
<i>Botrytis cinerea</i>	Témoin + <i>B. cinerea</i>	Cible	30	30	-	Signal attendu sur FAM Amplification croisée faible sur Atto425
	<i>B. fabae</i>	Non-cible	30	30	-	Amplification croisée tardive sur canal Atto425 et FAM
<i>Fulvia fulva</i>	Témoin + <i>F. fulva</i>	Cible	-	-	28,5	Signal attendu sur TAMRA Pas de signal sur les autres canaux
	<i>P. chromolaenae</i>	Non-cible	30	-	19,59	Amplification croisée sur TAMRA
	<i>P. guazumae</i>	Non-cible	-	-	20,15	Amplification croisée sur TAMRA
	<i>C. beticola</i>	Non-cible	30	-	25,38	Amplification croisée sur TAMRA

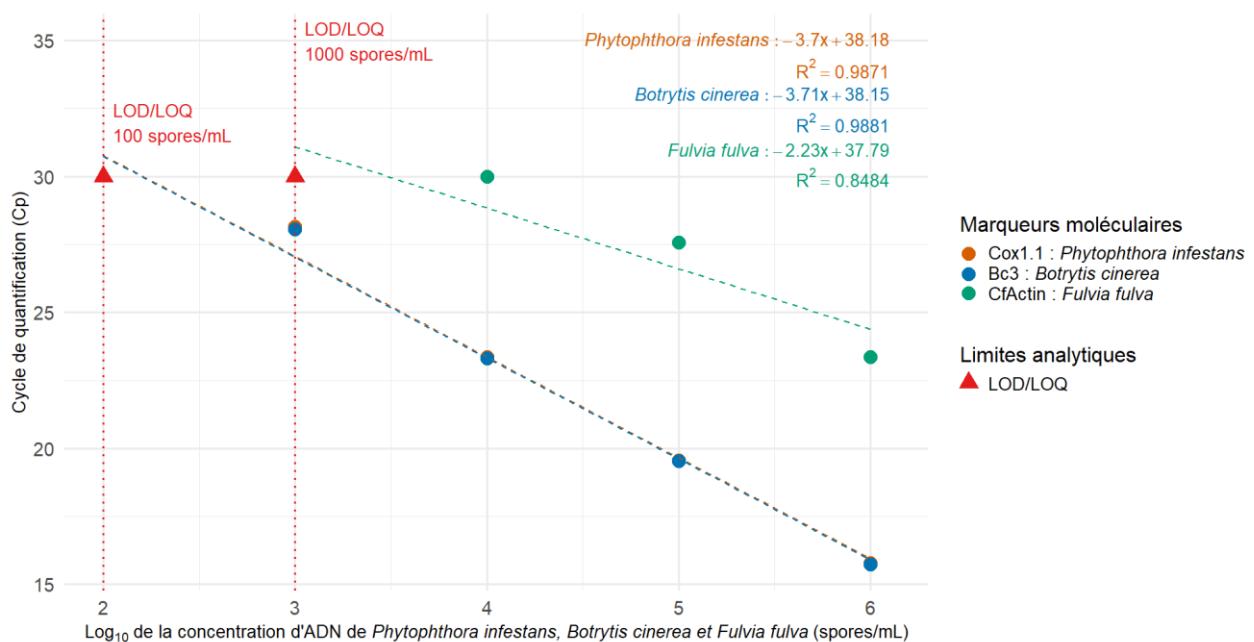


Figure 15 : Régression linéaire entre le logarithme de la concentration en ADN de *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* et *Fulvia fulva*, et le cycle seuil (Cp) pour les amorces Cox1.1, Bc3 et CfActin. Les Cp montrent une relation linéaire inversement proportionnelle au logarithme de la concentration. La limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) est fixée à 10^2 spores/mL pour *P. infestans* et *B. cinerea*, et à 10^3 spores/mL pour *F. fulva*.

Les espèces non cibles de *F. fulva*, comprenant *P. chromolaenae*, *P. guazumae* et *C. beticola*, présentent des amplifications croisées sur TAMRA, avec des Cp compris entre 19,59 et 25,38. Il est également à noter que *P. chromolaenae* montre un signal tardif sur le canal Atto425.

Ces observations mettent en évidence des interférences spectrales entre Atto425 et FAM, limitant la différenciation de certains marqueurs dans le protocole multiplex. Ainsi, les signaux inattendus observés pour *B. cinerea* et *P. infestans* sur des canaux non spécifiques peuvent être expliquées par ces interférences. Le Tableau XII résume l'ensemble des résultats d'amplification obtenus pour les souches cibles et non cibles, avec les Cp relevés sur les trois canaux correspondant aux sondes des trois agents phytopathogènes.

c) Performances analytiques (courbes d'étalonnage, LOD, LOQ)

L'évaluation des performances analytiques des amorces spécifiques associées à leurs sondes fluorescentes pour *P. infestans*, *B. cinerea* et *F. fulva* est réalisée à partir de suspensions calibrées de spores, couvrant une gamme comprise entre 10^2 et 10^6 spores/mL. Pour chaque concentration, le cycle de quantification a été mesuré en conditions de multiplex avec détection spécifique par les sondes et les réplicas techniques présentent une variation très faible, confirmant la reproductibilité de l'approche.

L'analyse des données expérimentales montre que pour *P. infestans* (Cox1.1), les Cp augmentent de 15,78 cycles à 10^6 spores/mL à 28,15 cycles à 10^3 spores/mL, avec des CV inférieurs à 0,15 %. À 10^2 spores/mL, l'amplification est encore détectée, avec un Cp tardif de 30. La LOD et la LOQ sont donc fixées à 10^2 spores/mL.

Concernant *B. cinerea*, les données doivent être interprétées avec prudence. En effet, des interférences spectrales entre FAM et Atto425 compliquent l'interprétation des signaux, rendant difficile de distinguer *B. cinerea* de *P. infestans* sur le canal FAM. En conséquence, une réévaluation avec une sonde neuve et un fluorophore différent est nécessaire pour confirmer ces valeurs et assurer la sensibilité de ces marqueurs.

En revanche, les marqueurs moléculaires associés à *F. fulva* présentent une sensibilité plus limitée. Les Cp sont de 23,36 à 10^6 spores/mL, tandis qu'à 10^2 spores/mL, l'amplification n'est pas systématiquement détectée, certains réplicas restant non amplifiés. Dans ce cas, la LOD et la LOQ sont fixées à 10^3 spores/mL, avec un CV qui reste supérieur à 0,5 % dès 10^5 spores/mL, traduisant une reproductibilité moins bonne que pour les deux autres agents pathogènes.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment la haute performance des systèmes de détection moléculaire multiplex pour *P. infestans* et *B. cinerea*, tandis que la détection de *F. fulva* reste plus limitée, comme illustré dans la Figure 15.

Tableau XIII : Cinétique d'apparition des symptômes foliaires sur feuilles de tomate inoculées avec quatre agents pathogènes lors des six bioessais réalisés en conditions contrôlées, avec prélèvements pour analyses moléculaires.

Numéro de l'essai	Agent pathogène	Apparition des symptômes
Essai 1	<i>P. infestans</i>	J+3
	<i>B. cinerea</i>	Pas de symptômes observés
Essai 2	<i>P. neolyccopersici</i>	J+8
	<i>F. fulva</i>	J+10
Essai 3	<i>P. neolyccopersici</i>	J+8
	<i>F. fulva</i>	Pas de symptômes observés
Essai 4	<i>P. infestans</i>	J+5
	<i>B. cinerea</i>	J+3
Essai 5	<i>P. neolyccopersici</i>	J+9
	<i>F. fulva</i>	J+12
Essai 6	<i>P. infestans</i>	J+4
	<i>B. cinerea</i>	J+4

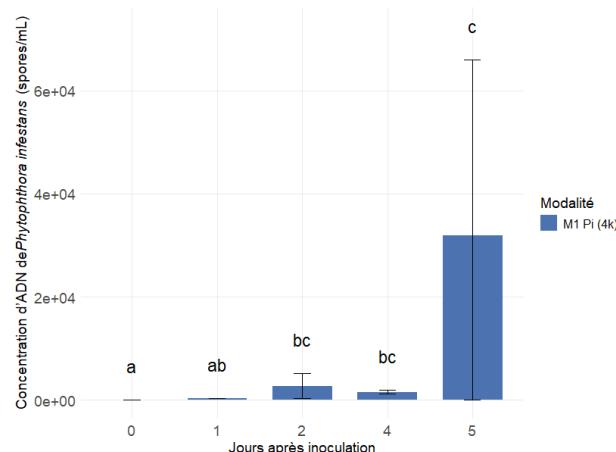


Figure 16 : Évolution de la concentration d'ADN de *Phytophthora infestans* au cours du temps. La quantification de l'ADN (spores/mL) a été réalisée à l'aide des amores Cox1.1 du jour 0 au jour 5 après inoculation à 4 000 spores/mL à J0. Les barres représentent l'écart type. Les lettres indiquent les groupes significativement différents (test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons par le test de Dunn, $p < 0,05$) : les jours partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

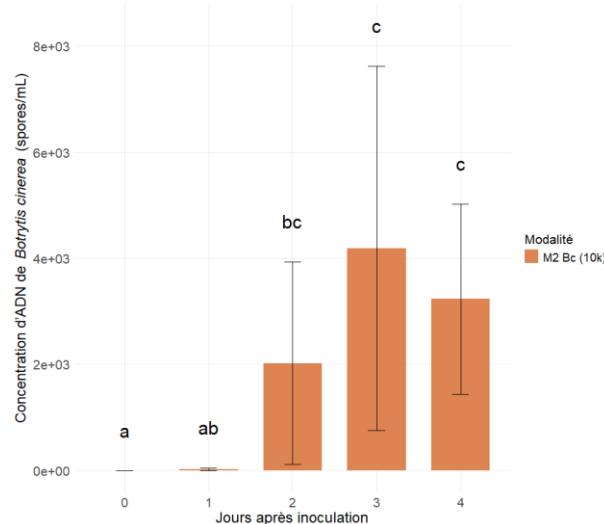


Figure 17 : Évolution de la concentration d'ADN de *Botrytis cinerea* au cours du temps. La quantification de l'ADN (spores/mL) a été réalisée à l'aide des amores Bc3 du jour 0 au jour 4 après inoculation à 10 000 spores/mL à J0. Les barres représentent l'écart type. Les lettres indiquent les groupes significativement différents (test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons par le test de Dunn, $p < 0,05$) : les jours partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

3) Essais sur plantes

L'apparition des symptômes foliaires sur plants de tomate, selon les différents essais réalisés, est présentée dans le Tableau XIII. Ce tableau détaille la cinétique d'apparition des symptômes pour chaque agent pathogène inoculé, lors des six essais effectués en conditions contrôlées.

a) Mildiou

L'évolution de la concentration en ADN de *P. infestans* a été suivie par qPCR à l'aide du couple d'amorces Cox1.1, dans l'essai 4. La quantification a été réalisée uniquement pour la modalité M1, correspondant à une inoculation au jour 0 avec une suspension de 4 000 spores/mL. La modalité témoin non inoculée a été quantifiée, mais n'ayant montré aucune présence détectable d'ADN, elle n'a pas été incluse dans cette analyse. Les concentrations d'ADN, mesurées à différents jours post-inoculation, ne suivent pas une distribution normale, comme l'indiquent les résultats du test de Shapiro-Wilk (p -value < 0,05). Par conséquent, un test non paramétrique est utilisé. Le test de Kruskal-Wallis révèle une différence significative des concentrations entre au moins deux jours (p -value = 0,0048). Les comparaisons multiples *post hoc*, réalisées avec un test de Dunn pour les comparaisons multiples, montrent que les concentrations aux jours 2 (p -value = 0,0099), 4 (p -value = 0,042) et 5 (p -value = 0,00029) sont significativement plus élevées que celles mesurées au jour 0. De plus, les concentrations au jour 5 sont également significativement plus élevées qu'au jour 1 (p -value = 0,039) (Figure 16).

b) Botrytis

La quantification de l'ADN de *B. cinerea* est réalisée à l'aide des amorces Bc3 dans l'essai 4 et concerne la modalité M2 correspondant à une inoculation au jour 0 avec une suspension de 10 000 spores/mL. Cette analyse concerne uniquement la modalité inoculée par ce champignon pathogène, car la modalité témoin non inoculée n'a révélé aucune présence d'ADN de *B. cinerea*. Les concentrations d'ADN quantifiées à différents jours post-inoculation, à l'aide du couple d'amorces Bc3, ne suivent pas une distribution normale, comme l'indique le test de Shapiro-Wilk (p -value < 0,05). L'analyse non paramétrique par test de Kruskal-Wallis met en évidence une différence statistiquement significative entre les jours d'échantillonnage (p -value = 0,000463). Les comparaisons *post hoc* effectuées avec le test de Dunn ont révélé que les concentrations d'ADN aux jours 0 et 1 ne diffèrent pas significativement (p -value = 0,634). En revanche, les concentrations mesurées aux jours 2, 3 et 4 sont significativement plus élevées que celles observées au jour 0 (p -value = 0,0078 ; 0,00038 ; 0,00074, respectivement). Comparées au jour 1, les concentrations sont également plus élevées pour 3 et 4 (p -value = 0,00695 ; 0,01107) (Figure 17).

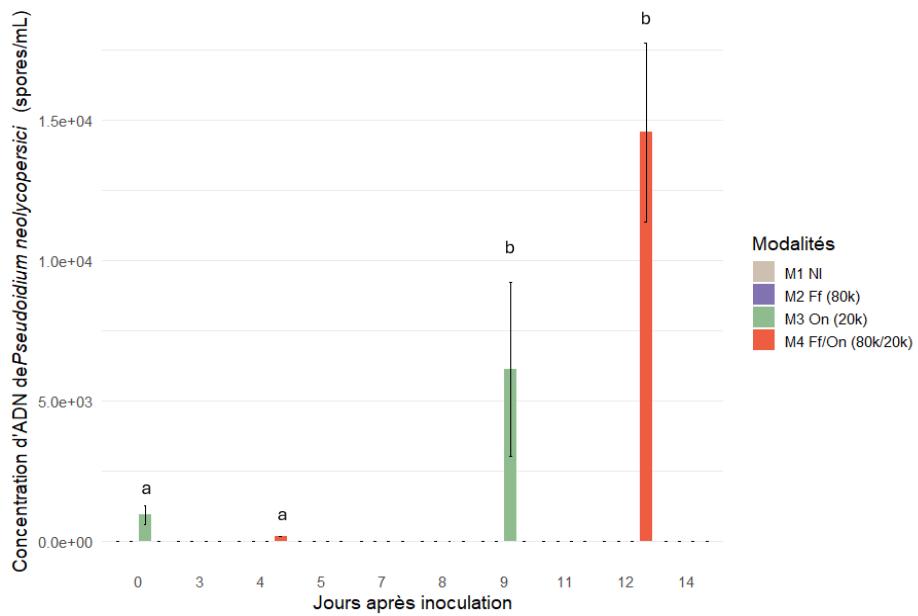


Figure 18 : Évolution de la concentration d'ADN de *Pseudoidium neolycopersici* au cours du temps. La quantification de l'ADN a été réalisée à l'aide des amores *OnTub2.1* du jour 0 au jour 14 dans les modalités M1 (non inoculé), M2 (inoculation de *Fulvia fulva*), M3 (inoculation seule) et M4 (co-inoculation avec *F. fulva*). Les barres représentent l'écart type. Les lettres indiquent les différences significatives entre les jours (test de Dunn, $p < 0,05$) : les jours partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

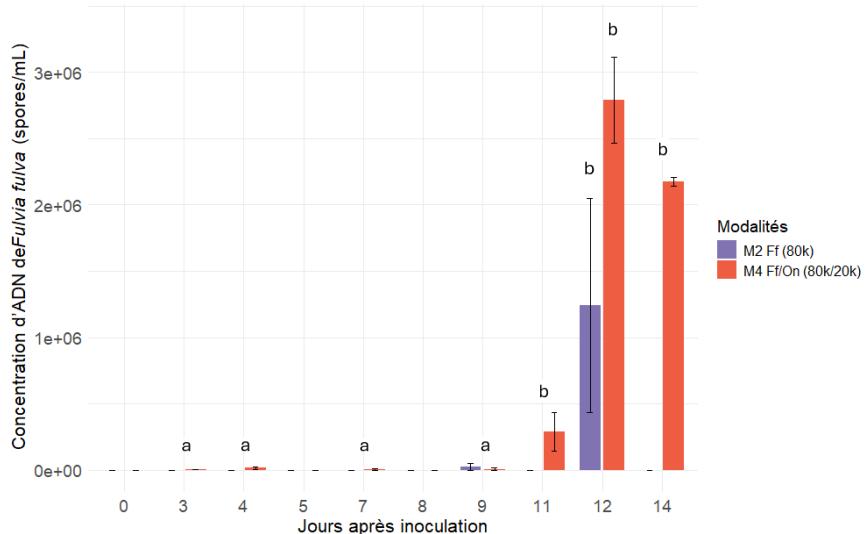


Figure 19 : Évolution de la concentration d'ADN de *Fulvia fulva* au cours du temps. La quantification de l'ADN a été réalisée à l'aide des amores CfActin du jour 0 au jour 14 dans les modalités M2 (inoculation seule) et M4 (co-inoculation avec *Pseudoidium neolycopersici*). Les barres représentent l'écart type. Les lettres indiquent les différences significatives entre les jours (test de Dunn, $p < 0,05$) : les jours partageant la même lettre ne diffèrent pas significativement.

c) Oïdium

Concernant le champignon phytopathogène *P. neolyopersici*, les concentrations d'ADN déterminées par qPCR à l'aide du couple d'amorces OnTub2.1 dans l'essai 5 sont obtenues pour quatre modalités expérimentales distinctes : un témoin non inoculé (M1), une modalité M2 correspondant à l'inoculation de *F. fulva* à 80 000 spores/mL au J0, une modalité M3 avec une inoculation uniquement de *P. neolyopersici* à 20 000 spores/mL et une modalité M4 correspondant à une co-inoculation par *F. fulva* (80 000 spores/mL) et *P. neolyopersici* (20 000 spores/mL). Les distributions obtenues ne respectent pas l'hypothèse de normalité (test de Shapiro-Wilk, *p*-value < 0,05). Le test de Kruskal-Wallis indique un effet significatif du facteur temporel « Jour » sur la concentration d'ADN (*p*-value = 0,0002). Les comparaisons post hoc par test de Dunn indiquent que les concentrations aux jours J9 et J12 sont significativement plus élevées que celles observées aux jours J0 et J4 (*p*-value = 0,007 et 0,008 respectivement). Ces données mettent en évidence une accumulation progressive d'ADN de *P. neolyopersici*, particulièrement marquée aux stades intermédiaires et tardifs de l'expérimentation, suggérant une intensification de la colonisation de l'hôte (Figure 18).

d) Cladosporiose

L'analyse des concentrations d'ADN de *F. fulva*, mesurées à différents jours post-inoculation avec les amorces CfActin, se concentre spécifiquement sur les modalités M2 et M4. Ces modalités correspondent à une inoculation de *F. fulva* seule à 80 000 spores/mL (M2) et en co-inoculation avec *P. neolyopersici* à 20 000 spores/mL et *F. fulva* à 80 000 spores/mL (M4). Les données de concentrations d'ADN obtenues ne présentent pas de distribution normale (test de Shapiro-Wilk, *p*-value < 0,05). Par conséquent, un test statistique non paramétrique est appliqué afin d'évaluer l'effet du facteur « Jour ». Le test de Kruskal-Wallis révèle une différence globale significative entre les jours (*p*-value = 0,04506). Les comparaisons post hoc par test de Dunn indiquent que les concentrations aux jours J3, J4, J7 et J9 sont significativement plus faibles que celles observées aux jours J11, J12 et J14 (*p*-value < 0,05). Ces résultats mettent en évidence une accumulation progressive d'ADN fongique, particulièrement marquée aux stades tardifs de l'expérimentation, suggérant une intensification de la colonisation de l'hôte (Figure 19).

IV. Discussion

1) Validation expérimentale sur souches fongiques des amorces en simplex

a) Spécificité et performances des amorces

L'évaluation de la spécificité des amorces révèle que la conception *in silico* constitue une étape cruciale pour anticiper le risque d'amplifications non spécifiques.

Les amorces Bc3 et CfActin présentent une spécificité robuste pour *Botrytis cinerea* et *Fulvia fulva*, confirmée par les écarts significatifs des températures de fusion chez les souches non cibles. Ces résultats illustrent l'importance de sélectionner des régions génétiques suffisamment discriminantes, ici l'*ITS* pour *B. cinerea* et le gène de l'*actine* pour *F. fulva*.

Pour *Phytophthora infestans* et *Pseudoidium neolyopersici*, les amorces initiales ciblant l'*ITS* (INF et ON) présentent un risque d'amplification croisée sur des espèces proches, ce qui reflète les observations de Kiss (2012), selon lesquelles l'*ITS* peut manquer de résolution pour distinguer des espèces apparentées. Les nouvelles amorces, ciblant *Cox1* pour *P. infestans* et β -*Tubuline* 2 pour *P. neolyopersici*, améliorent la spécificité, bien que *Cox1.1* conserve une faible différence de Tm entre les souches cibles et non cibles, reflétant une conservation des séquences ciblées.

Les performances analytiques des amorces confirment leur fiabilité et leur sensibilité, avec une linéarité des courbes d'étalonnage et une faible variabilité intra- et inter-série. Les LOD et LOQ atteignent 10^2 spores/mL pour la majorité des amorces, suffisantes pour une détection précoce des agents pathogènes. Pour OnTub2.1, la LOD plus élevée reflète une limitation du marqueur choisi, celui-ci pouvant être moins représenté ou moins amplifiable dans le génome. Cela peut diminuer la sensibilité pour détecter de faibles quantités d'ADN. Ces résultats confirment que la sélection du gène cible et la validation *in silico* sont déterminantes pour garantir fiabilité et sensibilité et permettre une détection précoce.

b) Sélection finale des amorces optimales

La sélection finale des amorces repose sur la spécificité, la sensibilité et la reproductibilité expérimentale. Les amorces Bc3 et CfActin se distinguent comme les plus adaptées pour la détection de *B. cinerea* et *F. fulva*, grâce à une discrimination nette entre souches cibles et non cibles et à des performances analytiques fiables sur toute la gamme de concentrations testée.

Les amorces Cox1.1 présentent une sensibilité et une spécificité accrues par rapport aux amorces INF, mais ne garantissent pas une spécificité optimale. Il serait donc pertinent d'explorer des gènes plus discriminants, comme le gène *COI* (Cytochrome c Oxidase subunit I), dont la variabilité mitochondriale permet de distinguer les espèces proches au sein du genre *Phytophthora* (Mondragón-Flores *et al.*, 2025).

Concernant *P. neolyopersici*, OnTub2.1 offre une meilleure spécificité que les amorces initiales ON, mais sa sensibilité limitée le rend pertinent pour des charges infectieuses modérées ou élevées. Il reste néanmoins pertinent de valider expérimentalement ces amorces sur des souches proches, comme l'espèce *Erysiphe ligustri*, susceptible d'amplification croisée (Shin et al, 2019).

2) Validation expérimentale sur souches fongiques des amorces en multiplex

a) Spécificité et performances des systèmes multiplex

Le multiplexage permet la détection simultanée de plusieurs agents pathogènes avec une spécificité globalement satisfaisante. La sonde Cox1.1-Probe, ciblant *P. infestans*, présente des limites de discrimination dues à la conservation du gène, entraînant des amplifications croisées. Cette limitation s'explique par la forte conservation de la séquence du gène *Cox1* au sein du genre *Phytophthora*, réduisant la capacité de discrimination fine. Pour *B. cinerea*, les témoins positifs présentent des signaux tardifs sur Atto425 et FAM, ce qui suggère une amplification peu fiable et un recouvrement entre ces deux canaux, rendant leur distinction impossible. Dans ces conditions, il n'est pas possible de conclure sur la performance réelle du système. L'inefficacité observée pourrait être liée à une dégradation de la sonde, commandée il y a plusieurs années. Il serait donc pertinent d'en envisager le remplacement, idéalement avec un fluorophore distinct du canal Atto425, afin d'améliorer sa lisibilité et sa fiabilité. Concernant *F. fulva*, la détection est robuste et spécifique sur le canal TAMRA, bien que certaines espèces non cibles génèrent des signaux tardifs sur ce canal, traduisant un faible risque d'amplification croisée. Ces interférences peuvent notamment être liées aux interactions spectrales entre fluorophores.

Les performances analytiques confirment la fiabilité du système multiplex pour *P. infestans* (LOD et LOQ à 10^2 spores/mL), avec une sensibilité supérieure par rapport aux analyses en simplex. En revanche, pour *F. fulva*, la sensibilité est réduite, avec des LOD et LOQ à 10^3 spores/mL, alors qu'elles atteignaient 10^2 spores/mL en système simplex. Cette diminution de sensibilité reflète probablement des contraintes liées à la dynamique d'amplification en contexte multiplex, où la concurrence pour les réactifs de PCR peut réduire l'efficacité d'amplification des cibles à faible concentration. Ces résultats montrent que le multiplexage permet une détection simultanée efficace et reproductible de plusieurs agents pathogènes, tout en réduisant le temps et les coûts expérimentaux. Toutefois, la conception des sondes et le choix des fluorophores restent déterminants pour limiter les interférences et les amplifications croisées.

b) Optimisation et sélection des combinaisons d'amorces pour le multiplexage

L'optimisation des conditions repose sur la compatibilité des amorces et la limitation des interactions secondaires, tout en maximisant la discrimination des signaux fluorescents entre les différents canaux. Certaines combinaisons initiales révèlent des signaux croisés ou des

amplifications retardées, tandis que d'autres ont permis une détection claire et reproductible des souches cibles. L'efficacité des couples d'amorces et sondes s'appuie notamment sur la spécificité vis-à-vis des souches non cibles, la sensibilité analytique et la robustesse des résultats. Pour *P. infestans*, les performances en multiplex sont comparables à celles obtenues en simplex. Concernant *B. cinerea*, la sonde et le fluorophore choisis sont à revoir afin de résoudre les problèmes de recouvrement des canaux et d'améliorer la fiabilité des signaux en multiplex. Pour *F. fulva*, la sensibilité réduite illustre les contraintes propres au multiplexage. Afin de compléter et renforcer le système multiplex, il est nécessaire d'intégrer la sonde conçue *de novo* de *P. neolyopersici*, y compris sur des souches non cibles, afin d'évaluer les risques d'amplification croisée. Par ailleurs, la conception d'une sonde associée au témoin endogène UBI, basé sur l'amplification d'un fragment du gène constitutif de l'ubiquitine de la tomate, permettra de contrôler la qualité de l'ADN extrait, de détecter d'éventuels inhibiteurs et de confirmer l'absence d'amplifications non spécifiques. L'intégration de ce témoin, avec un fluorophore dédié, permettra un système multiplex à cinq cibles, améliorant ainsi la fiabilité et la validation des résultats.

Dans l'ensemble, ces combinaisons optimisées constituent une base fiable pour la détection simultanée et reproductible des agents pathogènes étudiés, avec un potentiel pour des applications en diagnostic précoce et en épidémiologie.

3) Validation expérimentale sur prélèvements issus des essais sur plantes

a) Corrélation entre les symptômes observés et les quantifications moléculaires

Les analyses montrent une corrélation temporelle cohérente entre l'apparition des symptômes et l'augmentation de la charge fongique quantifiée par qPCR, confirmant la dynamique typique des interactions plante-pathogène.

Pour *P. infestans*, l'ADN est détectable dès le jour 2 post-inoculation, tandis que les symptômes visibles apparaissent entre les jours 3 et 5 selon les essais. Ce décalage temporel illustre la phase latente classique de ce champignon biotrophe, où il se multiplie avant de provoquer des lésions visibles, ce qui correspond aux observations décrites chez la pomme de terre et la tomate (Llorente *et al.*, 2010). De même, *B. cinerea*, montre une augmentation significative de son ADN dès le jour 2, précédant l'apparition de la nécrose foliaire. Cette accumulation initiale sans symptôme reflète sa capacité à coloniser les tissus avant d'induire la mort cellulaire, en cohérence avec le mode de vie nécrotrophe décrit par Bi *et al.* (2023).

Pour *P. neolyopersici* et *F. fulva*, l'ADN fongique s'accumule progressivement, avec des pics correspondant approximativement à l'apparition des symptômes aux jours 9 et 12 respectivement. Cette observation indique que l'apparition des symptômes reflète une intensification progressive de la colonisation, plutôt qu'un déclenchement immédiat et que la charge en agent pathogène peut évoluer de manière asymptomatique pendant plusieurs jours.

Ces résultats illustrent l'importance d'associer les mesures phénotypiques et moléculaires pour une évaluation complète de la dynamique infection-maladie, en tenant compte des interactions hôte-agent pathogène modulées par les conditions environnementales et l'état physiologique de la plante (Shikano et Cory, 2015).

L'utilisation de la qPCR s'avère efficace pour détecter les agents pathogènes avant l'apparition des symptômes visibles, ce qui confirme son intérêt pour le diagnostic précoce. La sensibilité des amorces employées permet de suivre la progression de l'infection dès les stades asymptomatiques. Cette détection précoce est cruciale pour la mise en œuvre de stratégies de gestion phytosanitaire, permettant d'intervenir avant la propagation visible de la maladie et d'optimiser les traitements (Luchi et al., 2020). L'accumulation progressive de l'ADN observée chez tous les agents pathogènes analysés confirme que la qPCR est un outil fiable pour quantifier la charge infectieuse et suivre la dynamique de colonisation foliaire.

b) Limites et perspectives pour l'application en diagnostic précoce

Les marqueurs moléculaires développés montrent un potentiel pour la détection précoce des agents pathogènes grâce à une sensibilité suffisante pour identifier les infections avant l'apparition des symptômes.

Ces méthodes présentent des limites liées à la quantité initiale d'ADN pathogène, à la présence de composés inhibiteurs et à la spécificité des amorces, qui peut parfois entraîner des réactions croisées, notamment lors de quantification par multiplexage. Elles permettent néanmoins de réduire le temps et les ressources nécessaires, ce qui les rend particulièrement utiles pour l'échantillonnage sur le terrain. Toutefois, des protocoles optimisés et standardisés sont indispensables pour garantir fiabilité, précision et reproductibilité des mesures en conditions réelles.

Parmi les pistes d'amélioration, augmenter la quantité de matière prélevée, passant de 20 mg à 40 mg, permettrait d'accroître la concentration d'ADN pathogène, notamment pour les gènes faiblement représentés, tels que la β -Tubuline 2. L'intégration de contrôles internes robustes, comme une sonde UBI adaptée au multiplexage, permettrait de valider l'intégrité des échantillons et d'améliorer la reproductibilité des mesures. Le développement de nouvelles amorces plus spécifiques, ciblant des gènes discriminants entre espèces proches, pourrait réduire les risques de détection croisée, contournant les limites de certaines régions géniques classiques, telles que *ITS* et *Cox1*.

La validation de ces outils sur des échantillons issus de conditions réelles, incluant la variabilité génétique des souches et des environnements de culture, se révèle donc déterminant pour confirmer leur pertinence dans une stratégie de surveillance phytosanitaire efficace et durable. L'ensemble de ces améliorations vise à atteindre un diagnostic précoce fiable, permettant d'anticiper la progression des maladies et d'optimiser les interventions phytosanitaires.

V. Conclusion et perspectives

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet AGRIPOLHYS, dont l'ambition est de développer un outil innovant de détection précoce des maladies fongiques de la tomate grâce à la combinaison d'imagerie hyperspectrale, polarimétrique et d'analyses moléculaires. La problématique posée consistait à évaluer dans quelle mesure des méthodes de qPCR simplex et multiplex pouvaient constituer des outils de référence robustes pour la détection des principaux agents phytopathogènes de la tomate, incluant les espèces *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Pseudoidium neolyopersici* et *Fulvia fulva* et contribuer ainsi à la validation des technologies d'imagerie développées dans le projet. L'hypothèse centrale reposait sur l'idée que l'optimisation de couples d'amorces spécifiques et sensibles permettrait d'améliorer la fiabilité du diagnostic moléculaire, tout en ouvrant la voie à une approche multiplexe plus rapide et économique.

Les résultats obtenus confirment en grande partie cette hypothèse. Les tests *in silico* et expérimentaux ont permis de sélectionner des amorces performantes pour la majorité des microorganismes pathogènes, présentant une spécificité satisfaisante et des limites de détection compatibles avec un usage en conditions appliquées. La mise au point d'un multiplex intégrant plusieurs agents pathogènes a démontré la faisabilité de la démarche et constitue une première étape vers un outil de diagnostic plus rapide, économique et transférable aux conditions réelles de culture. De plus, les essais sur plantes ont validé la corrélation entre la détection moléculaire et l'expression symptomatique, renforçant l'intérêt des outils de biologie moléculaire comme référence pour l'apprentissage et la calibration des modèles d'imagerie hyperspectrale et polarimétrique.

Cependant, plusieurs limites doivent être soulignées. Sur le plan méthodologique, certaines amorces publiées se sont révélées peu spécifiques, nécessitant la conception *de novo* et un temps de validation conséquent. L'absence actuelle de certaines sondes spécifiques, en particulier pour *P. neolyopersici*, limite la validation de la méthode par multiplexage.

La réalisation de bioessais impliquant l'inoculation des quatre agents pathogènes constitue une étape essentielle, nécessitant notamment la synchronisation des cycles infectieux afin de pouvoir tester le système multiplex pour les quatre cibles. Enfin, l'application en conditions réelles, notamment dans des serres de production, n'a pas encore été abordée et reste une étape essentielle pour valider la transférabilité des méthodes. Ces deux étapes (co-inoculation des quatre agents pathogène et essais en serre de production) sont prévues dans les prochains mois du projet.

En termes d'impact pour Vegenov, ce travail a permis d'atteindre une partie des objectifs initiaux, notamment par le développement et la validation de nouvelles amorces spécifiques ainsi que la mise à disposition de protocoles optimisés, utilisables dans d'autres projets. Ces méthodes ont

ainsi été appliquées à l'analyse moléculaire de spores en suspension dans l'air prélevées par captage de spores dans des essais en serres de production présentant des symptômes de *Fulvia fulva*, incluant l'extraction d'ADN et la quantification de spores sur des échantillons collectés sur le terrain, illustrant la complémentarité entre le travail en serre et les analyses en laboratoire. Ces résultats renforcent non seulement l'expertise de Vegenov en biologie moléculaire appliquée à la santé des plantes, mais ouvrent aussi la possibilité de valoriser ces méthodes dans de futurs projets collaboratifs ou partenariaux avec les filières agroalimentaires et végétales.

Pour le projet AGRIPOLHYS, les résultats constituent une avancée décisive. Les données moléculaires générées apportent une base solide pour entraîner et valider les modèles d'intelligence artificielle développés à partir des images hyperspectrales et polarimétriques.

En conclusion, ce travail démontre l'apport essentiel des outils moléculaires pour la détection précoce des maladies fongiques de la tomate et confirme la pertinence de leur intégration dans une approche multimodale combinant analyses moléculaires et imagerie avancée. Malgré des défis encore à relever, comme la mise au point d'un système par multiplexage finalisé et la validation en conditions réelles, les perspectives ouvertes sont prometteuses et portent des applications concrètes pour une agriculture de précision, plus durable et respectueuse de l'environnement.

En complément des missions liées à ma problématique principale, j'ai également participé à plusieurs activités me permettant d'élargir mes compétences techniques et de découvrir d'autres domaines au sein de Vegenov. J'ai notamment contribué à l'analyse moléculaire de cassettes de spores de *Fulvia fulva*, en réalisant l'extraction d'ADN et la quantification des spores à l'aide de marqueurs spécifiques de ce champignon phytopathogène. Ces travaux s'inscrivent dans un programme de recherche avec la filière légumière régionale, en collaboration avec la société Spornado, qui commercialise les capteurs de spores. Ces analyses ont permis de mesurer l'efficacité des marqueurs sur des échantillons issus du terrain, mettant en évidence la complémentarité entre les observations en serre et les évaluations en laboratoire. Par ailleurs, j'ai participé à un projet de sauvetage d'embryon, consistant à ouvrir des fruits et à effectuer la culture *in vitro* des embryons extraits. J'ai également pris part à des tests d'analyse sensorielle portant sur différentes variétés de tomates, dans le cadre d'évaluations organoleptiques. Ces activités m'ont permis d'approfondir mes compétences techniques en biologie cellulaire et biologie moléculaire, tout en appréhendant l'importance de l'évaluation sensorielle dans l'amélioration variétale.

Bibliographie

- Abad, Z.G., Burgess T.I., Bourret T., et al., (2023). *Phytophthora* : taxonomic and phylogenetic revision of the genus. *Studies in Mycology*, 106 : 259-348.
- Oliveira A., Ketrin N., Moreira O.C., Lavigne A., et al., (2019). Analytical validation of real-time quantitative PCR assays for optimum diagnosis of *Vivax malaria*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 114:180-350.
- Andrivon D. (1994). Dynamics of the survival and infectivity to potato tubers of sporangia of *Phytophthora infestans* in three different soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:945-52.
- Bakhshi M., Zare R., Braun U., Taheri H. (2021). Polyphasic taxonomy of four *Passalora*-like taxa occurring on fruit and forest trees. *Mycological Progress*, 20:1157-73.
- Bi K., Liang Y., Mengiste T., Sharon A. (2023). Killing softly: A roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28:211-22.
- Birch, P.R.J., Whisson S.C. (2001). *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology*, 2:257-63.
- Blair J.E., Coffey M.D., Martin F.N (2012). Species tree estimation for the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, and close relatives. *PLoS ONE*, 7e37003.
- Carey J., Hambleton S., Shoukouhi P., Braun U., Bradshaw M., Liu M. (2025). *Erysiphe parmeleeanana* sp. nov.: a new powdery mildew species on oak trees from Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*? 47:382-92.
- Carisse O. Van der Heyden H. (2015). Relationship of airborne *Botrytis cinerea* conidium concentration to tomato flower and stem infections: a threshold for de-leaving operations. *Plant Disease*, 99:137-42.
- Cooke D.E.L., Cano L.M, Raffaele S., et al. (2012). Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLOS Pathogens*, 8:100-2940.
- De Cara M., Heras F., Santos M., Tello Marquina J.C (2008). First report of *Fulvia fulva*, causal agent of tomato leaf mold, in greenhouses in southeastern Spain. *Plant Disease*, 92:1371.
- Dickman M.B. (2007). Subversion or coercion : Pathogenic determinants in fungal phytopathogens. *Fungal Biology Reviews*, 21:125-29.
- Eizner E., Ronen M., Gur Y., Gavish A., Zhu W., Sharon A. (2017). Characterization of *Botrytis*–plant interactions using pathtrack© - an automated system for dynamic analysis of disease development. *Molecular Plant Pathology*, 18:503 12.
- Fekrikohan S., Sharifnabi B., Javan-Nikkhah M., Pollastro S., Faretra F., De Miccolis Angelini R.M. (2024). Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis* populations from economic and wild host plants in Iran. *Journal of Fungi*, 10:764.
- Forootan A., Sjöback R., Björkman J., Sjögren B., Linz L., Kubista M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12:16.
- Fry W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and r gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9:385 402.
- Gachon C. Saindrenan P. (2004). Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42:367-71.
- Gouriet, F., Raoult D. (2009). Diagnostic microbiologique : du diagnostic par étiologie au diagnostic par syndrome. *Antibiotiques*, 11:37 48.
- Grenville-Briggs L.J., Avrova A., Bruce C.R., et al. (2005). Elevated amino acid biosynthesis in *Phytophthora infestans* during appressorium formation and potato infection. *Fungal Genetics and Biology*, 42:244 56.
- Griffith G.W., Snell R., Shaw D.S. (1995) Late blight (*Phytophthora infestans*) on tomato in the tropics. *Mycologist*, 9:87-89.

- Grünwald N. J., Forbes G.A, Perez-Barrera W., Stewart J.E, Fieland F.J, Larsen M.M. (2019). *Phytophthora urerae* sp. nov., a new clade 1c relative of the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans* from South America. *Plant Pathology*, 68:557-65.
- Huggett, J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. (2005). Real-Time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity*, 6:279-84.
- Hussain S., Lees A.K., Duncan J.M., Cooke D.E.L (2005). Development of a species-specific and sensitive detection assay for *Phytophthora infestans* and *Its Application for Monitoring of Inoculum in Tubers and Soil*. *Plant Pathology*, 54:373-82.
- Hussain T., Singh B.P. Anwar F. (2014). A quantitative real time PCR based method for the detection of *Phytophthora infestans* causing late blight of potato, in infested soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21:380 86.
- Jones H., Whipps J.M. Gurr S.J. (2001). The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolyopersici*. *Molecular Plant Pathology*, 2:303-9.
- Judelson H.S., Flavio A. Blanco. (2005). The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3:47-58.
- Kamoun S., Furzer O., Jones J.D.G., et al. (2015). The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16:413-34.
- Khan M., Li B., Jiang Y., Weng Q., Chen Q. (2017). Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the Ypt1 gene. *Frontiers in Microbiology*, 8:1234
- Kiss L. (2012). Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (*ITS*) sequences as species barcodes for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109-1811.
- Kiss L., Takamatsu S., Cunningham J.H. (2005). Molecular identification of *Oidium neolyopersici* as the causal agent of the recent tomato powdery mildew epidemics in North America. *Plant Disease*, 89:491-96.
- Latorre, B. A., Besoain X. (2002). Occurrence of severe outbreaks of leaf mold caused by *Fulvia fulva* in greenhouse tomatoes in chile. *Plant Disease*, 86:694.
- Lebeda A., Lobin K.K., Mieslerová B., Křivánková T., Kitner M. (2024). Occurrence and Epidemiological Consequences of *Erysiphe neolyopersici* on Tomato Plants in Mauritius. *Mycological Progress*, 23:53.
- Lees, A. K., Sullivan L., Lynott J.S., Cullen D.W. (2012). Development of a quantitative real-time pcr assay for *Phytophthora infestans* and its applicability to leaf, tuber and soil samples. *Plant Pathology*, 61:867-76.
- Lievens B., Brouwer M., Vanachter A., Cammue B., Thomma B. (2006). Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science*, 171:155-65.
- Llorente B., Bravo-Almonacid F., Cvitanich C., et al. (2010). A quantitative real-time PCR method for in planta monitoring of *Phytophthora infestans* growth. *Letters in Applied Microbiology*, 51:603-10.
- Lucentini C.G., Medina R., Franco M.E.E., Saparrat M.C.N., Balatti P.A. (2021). *Fulvia fulva* (Syn. *Cladosporium Fulvum*, *Passalora Fulva*) races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic Avr and Ecp gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 159:525-42.
- Luchi N., Loos R., Santini A. (2020). Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104:2453-68.
- Mahlein A.K., (2016). Plant disease detection by imaging sensors - Parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant Disease*, 100:241-51.
- Mahlein A.K., Kuska M.T., Behmann J., Polder G., Walter A. (2018). Hyperspectral sensors and imaging technologies in phytopathology: state of the art. *Annual Review of Phytopathology*, 56:535-58.
- Mahlein A.K., Arnal Barbedo J.G., Chiang K.S., Del Ponte E.M., Bock C.H. (2024). From detection to protection: The role of optical sensors, robots, and artificial intelligence in modern plant disease management. *Phytopathology*, 114:1733 41.

McCoy A.G., Miles T.D., Bilodeau G.J., et al. (2020). Validation of a preformulated, field deployable, recombinase polymerase amplification assay for *Phytophthora* species. *Plants*, 9: 4.

Mondragón-Flores A., Soto-Plancarte A., Rodríguez-Alvarado G., et al. (2025). First report of *Phytophthora mengei* causing root rot and canker in avocado (*Persea Americana*) in Michoacán, Mexico. *Microorganisms*, 13:1471.

Pacific Northwest Pest Management Handbooks. (2015). Greenhouse plants, tomato-leaf mold. Text. OSU Extension Service - Extension Communications, 09.11.

Rosa S. de la, Schol C.R., Ramos Peregrina Á., et al. (2024). Sequential breakdown of the Cf-9 leaf mould resistance locus in tomato by *Fulvia fulva*. *New Phytologist*, 243:1522 38.

Sarthou J.-P., Sester M., Lamichhane J.-R., Aubertot J.-N., Sarthou V., Suffert F. (2024). Effets des pratiques d'agriculture de conservation des sols sur les maladies cryptogamiques. L'agriculture de conservation des sols. Quae, Versailles, pp. 173-187.

Savary S., Willocquet L., Pethybridge S.J., Esker P., McRoberts N., Nelson A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3:430-39.

Schena L., Li Destri Nicosia M.G., Sanzani S.M., Faedda R., Ippolito A., Cacciola S.O. (2013). Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic Fungi and oomycetes. *Journal of Plant Pathology*, 95:7-24.

Sharma G., Dwibedi V., Seth C.S., et al. (2024). Direct and indirect technical guide for the early detection and management of fungal plant diseases. *Current Research in Microbial Sciences*, 7:100-276.

Shikano I., Cory J.S. (2015). « Impact of environmental variation on host performance differs with pathogen identity: implications for host-pathogen interactions in a changing climate. *Scientific Reports*, 5:15351.

Shin H.-D., Meeboon J., Takamatsu S., Adhikari M.K., Braun U. (2019). Phylogeny and taxonomy of *Pseudoidium pedaliacearum*. *Mycological Progress*, 18:237-46.

Staats M., van Baarlen P., Van Kan J.A.L. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22:333-46.

Stergiopoulos I., Groenewald M., Staats M., Lindhout P., Crous P.W., De Wit P.J.G.M. (2007). « Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* ». *Fungal Genetics and Biology*, 44:415-29.

Strange R.N., Scott P.R. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* 43 (Volume 43, 2005), 83-116.

Suarez M.B., Walsh K., Boonham N., O'Neill T., Pearson S., Barker I. (2005). Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:890-99.

Thomma B.P.H.J., Van Esse H.P., Crous P.W., De Wit P.J.G.M. (2005). *Cladosporium fulvum* (Syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology*, 6:379-93.

Tucker S.L., Talbot N.J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 39:385-417.

Venbrux M., Crauwels S., Rediers H. (2023). Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Frontiers in Plant Science*, 14-376.

Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J.A.L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8:561-80.

Sitographie

Blancard, D. (INRAE) (2013). *Tomate – Passalora fulva (Cladosporium fulvum, cladosporiose)*. [Dernière modification : 05/07/2013] / <https://ephytia.inra.fr/fr/C/5087/Tomate-Passalora-fulva-Cladosporium-fulvum> (consulté le 04/08/2025).

Ecotoxicologie.fr (2019). Les bioessais de laboratoire : évaluer la toxicité des polluants en conditions contrôlées. [consulté le 26/08/2025] / <https://ecotoxicologie.fr/evaluer-en-laboratoire>

Fade J., Stolz C., Devlaminck V. (2021). L'imagerie polarimétrique. Photoniques, 109, 57–59. [consulté le 26/08/2025] / <https://www.photoniques.com/articles/photon/pdf/2021/04/photon2021109p57.pdf>

Institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC) (2009). Comprendre des résultats de qPCR. [consulté le 24/08/2025] / https://genomique.iric.ca/resources/files/Comprendre_les_resultats_qPCR.pdf

INRAE (1991). Glossaire de génétique moléculaire et génie génétique. [consulté le 24/08/2025] / <https://opendata.inrae.fr/GGMGG/26>

INRAE (2001). La PCR quantitative en temps réel ou la "TaqMan". Montpellier : INRAE. [consulté le 24/08/2025] / <https://www1.montpellier.inrae.fr/biochimie/td/UB/TD/VMJ-taqman.pdf>

Lee S. (2025). Haustorium: The Ultimate Plant Parasite. [consulté le 24/08/2025] / <https://www.numberanalytics.com/blog/ultimate-guide-haustorium-plant-morphology>

SANDRE (2010). Processus d'acquisition des données physico-chimiques et microbiologiques. [consulté le 26/08/2025] / <https://www.sandre.eaufrance.fr/urn.php?urn=urn:sandre:dictionnaire:ALQ:FRA:::ressource:2.1:::pdf>

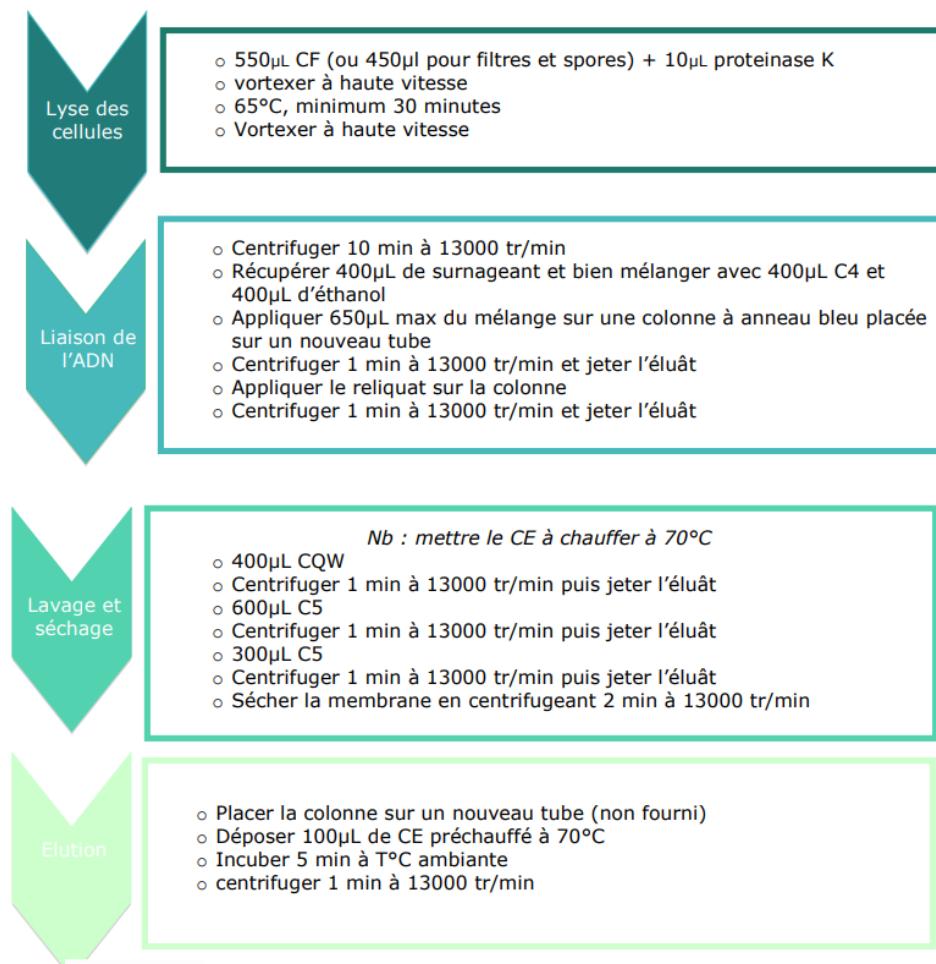
Thermo Fisher Scientific (2022). Multiplex vs. Singleplex qPCR: What Do I Need To Know? [consulté le 26/08/2025] / <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/multiplex-vs-singleplex-qpcr-what-do-i-need-to-know/>

Thermo Fisher Scientific (2025). « Qu'est-ce que le Ct dans la PCR en temps réel ?» [consulté le 26/08/2025] / https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html?utm_

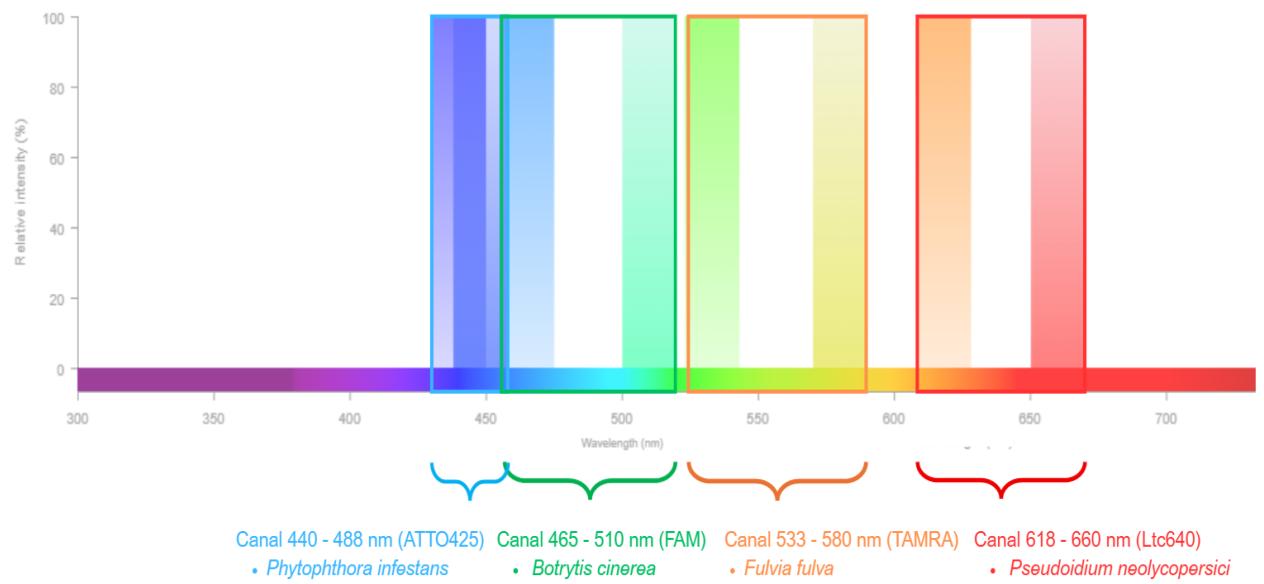
Thermo Fisher Scientific (2025). PCR en temps réel : Comprendre la valeur Ct (seuil de cycle). [consulté le 24/08/2025] / <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>

ANNEXES

Annexe I : Protocole détaillé d'extraction d'ADN utilisant le kit MN « Genomic DNA from FOOD » appliqué à différentes matrices biologiques.



Annexe II : Spectres d'excitation et d'émission des fluorophores sélectionnés pour le multiplexage qPCR à quatre canaux sur le système LightCycler® 480, pour la détection de Phytophthora infestans, Botrytis cinerea, Fulvia fulva et Pseudoidium neolyopersici.



Annexe III : Filtres d'excitation et d'émission disponibles sur le LightCycler® 480 et leurs combinaisons possibles. Les cases vertes indiquent les filtres utilisables, tandis que les cases rouges signalent les combinaisons non disponibles.

		Filtres d'excitation disponibles						
		440	488	510	580	610	640	660
Filtres d'émission disponibles	465							
	498							
	533							
	619							

Résumé

 	<p>Diplôme: Master</p> <p>Mention : Biologie Végétale (BV)</p> <p>Parcours : Plant Health Protection (PHP)</p>
Auteur : Philomène Dubois	Organisme d'accueil : Vegenov
Date de naissance : 08/11/2002	Adresse : 1040 Pen Ar Prat, 29250 Saint-Pol-de-Léon France
Nb pages : 30 Annexes : 3	Maître de stage : Klervi Crenn
Année de soutenance : 2025	
Titre français : Développement et optimisation de méthodes moléculaires pour une détection de la flore phytopathogène sur tomate dans le cadre du projet AGRIPOLHYS	
Titre anglais : Development and optimisation of molecular methods for detecting phytopathogenic flora on tomatoes as part of the AGRIPOLHYS project	
<p>Résumé :</p> <p>La culture de la tomate est impactée par plusieurs agents pathogènes majeurs, dont <i>Phytophthora infestans</i> (mildiou), <i>Pseudoidium neolyopersici</i> (oïdium), <i>Botrytis cinerea</i> (pourriture grise) et <i>Fulvia fulva</i> (cladosporiose). Dans le cadre du projet AGRIPOLHYS, visant au développement d'outils de détection précoce des maladies végétales, ce stage a porté sur la mise au point et l'optimisation de méthodes moléculaires basées sur la qPCR. Les travaux ont consisté à concevoir et tester des marqueurs moléculaires spécifiques pour chaque pathogène, en simplex et en multiplex, afin de garantir sensibilité et spécificité, tout en réduisant le temps et le coût d'analyse. Les amores validées ont été évaluées sur des souches de référence et sur des échantillons foliaires issus de bioessais en conditions contrôlées. Les résultats montrent une corrélation entre les niveaux de quantification moléculaire et l'expression des symptômes observés sur les plantes, confirmant la robustesse des méthodes développées. Ce travail contribue à fournir des protocoles fiables de détection précoce, indispensables à la gestion durable des maladies de la tomate, et constitue un appui essentiel au projet AGRIPOLHYS en vue de l'intégration des données moléculaires avec l'imagerie hyperspectrale et polarimétrique.</p>	
<p>Abstract :</p> <p>Tomato cultivation is impacted by several major plant pathogens, including <i>Phytophthora infestans</i> (late blight), <i>Pseudoidium neolyopersici</i> (powdery mildew), <i>Botrytis cinerea</i> (grey mould) and <i>Fulvia fulva</i> (cladosporiosis). As part of the AGRIPOLHYS project, which aims to develop tools for the early detection of plant diseases, this internship focused on the development and optimisation of molecular methods based on qPCR. The work consisted of designing and testing specific molecular markers for each pathogen, in simplex and multiplex, in order to guarantee sensitivity and specificity, while reducing analysis time and cost. The validated primers were evaluated on reference strains and on leaf samples from bioassays under controlled conditions. The results show a correlation between molecular quantification levels and the expression of symptoms observed on plants, confirming the robustness of the methods developed. This work contributes to provide reliable early detection protocols, which are essential for the sustainable management of tomato diseases, and provides essential support for the AGRIPOLHYS project with a view to integrating molecular data with hyperspectral and polarimetric imaging.</p>	
<p>Mots-clés : Maladies de la tomate, qPCR, Détection moléculaire, Champignons phytopathogènes, Diagnosic précoce, <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Pseudoidium neolyopersici</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Fulvia fulva</i>, AGRIPOLHYS</p>	
<p>Key Words : Tomato diseases, qPCR, Molecular detection, Fungal phytopathogens, Early diagnosis, <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Pseudoidium neolyopersici</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Fulvia fulva</i>, AGRIPOLHYS</p>	

